

日本国特許庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

PCT/JP00/05545

18.08.00

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

1999年12月27日

REC'D 05 OCT 2000

出願番号  
Application Number:

平成11年特許願第368991号

WIPO

PCT

出願人  
Applicant(s):

科学技術振興事業団

JP 00/05545

10/069541

EU  
#2

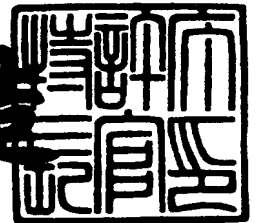
PRIORITY  
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 9月22日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2000-3076028

【書類名】 特許願

【整理番号】 A011P15

【提出日】 平成11年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/00

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県逗子市沼間 2-3-1-411

【氏名】 芳賀 達也

【発明者】

【住所又は居所】 東京都保谷市ひばりヶ丘北 4-1-6 リズひばりヶ丘 101

【氏名】 奥田 隆志

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代表者】 中村 守孝

【代理人】

【識別番号】 100107984

【弁理士】

【氏名又は名称】 廣田 雅紀

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第240642号

【出願日】 平成11年 8月27日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 044347

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 高親和性コリントランスポーター

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。

【請求項 2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

【請求項 3】 配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 4】 請求項 3 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする線虫由来の DNA。

【請求項 5】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

【請求項 6】 配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 7】 請求項 6 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするラット由来の DNA。

【請求項 8】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子。

(a)配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b)配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントラ

ンスポーター活性を有するタンパク質

【請求項 9】 配列番号 5 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 10】 請求項 9 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするヒト由来の DNA。

【請求項 11】 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードする遺伝子。

(a) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

【請求項 12】 配列番号 7 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む DNA。

【請求項 13】 請求項 12 記載の遺伝子を構成する DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするマウス由来の DNA。

【請求項 14】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

【請求項 15】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 16】 配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 17】 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 18】 配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 19】 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 20】 配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒ

ト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 21】 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

【請求項 22】 配列番号 8 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質。

【請求項 23】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質。

【請求項 24】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質。

【請求項 25】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質。

【請求項 26】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質。

【請求項 27】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 21 又は 22 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 23 記載の融合タンパク質。

【請求項 28】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体。

【請求項 29】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 28 記載の抗体。

【請求項 30】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 28 記載の抗体。

【請求項 31】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質

が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 28 記載の抗体。

【請求項 32】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 21 又は 22 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 28 記載の抗体。

【請求項 33】 抗体がモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項 28～32 のいずれか記載の抗体。

【請求項 34】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞。

【請求項 35】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞。

【請求項 36】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞。

【請求項 37】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞。

【請求項 38】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 21 又は 22 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞。

【請求項 39】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現することを特徴とする非ヒト動物。

【請求項 40】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物。

【請求項 41】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有

するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物。

【請求項 42】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物。

【請求項 43】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 21 又は 22 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物。

【請求項 44】 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 39～43 のいずれか記載の非ヒト動物。

【請求項 45】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 8～10 のいずれか記載の遺伝子又は DNA を導入することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法。

【請求項 46】 高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞が、請求項 8～10 のいずれか記載の遺伝子又は DNA が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞であることを特徴とする請求項 45 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法。

【請求項 47】 請求項 45 又は 46 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法により得られることを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞。

【請求項 48】 被検物質の存在下、請求項 14～22 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項 49】 被検物質の存在下、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、該細胞膜又は該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリント



ランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項50】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞が、請求項34～38のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞又は請求項47記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞であることを特徴とする請求項49記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項51】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、組換えタンパク質であることを特徴とする請求項48～50のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項52】 被検物質の存在下、請求項39～44のいずれか記載の非ヒト動物から得られた細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項53】 被検物質を非ヒト動物に投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項54】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項55】 高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を野生型非ヒト動物の場合と比較・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項56】 非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項52～55のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法。

【請求項57】 請求項48～56のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質。

【請求項58】 請求項48～56のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質。

【請求項59】 高親和性コリントランスポーターの活性増加又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項14～22のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項57記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物。

【請求項60】 高親和性コリントランスポーターの活性又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項14～22のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項58記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物。

【請求項61】 検体中の高親和性コリントランスポーターをコードするDNA配列を、請求項19又は20記載のタンパク質をコードするDNA配列と比較することを特徴とする高親和性コリントランスポーターの発現又は活性と関連

する疾病の診断方法。

【請求項 62】 請求項 19 又は 20 記載のタンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアルツハイマー症の診断用プローブ。

【請求項 63】 請求項 62 記載の診断用プローブ及び／又は請求項 28～33 のいずれか記載の抗体を含有することを特徴とするアルツハイマー症の診断薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらの利用に関する。

【0002】

【従来の技術】

全身の臓器に分布し、内分泌系と並んでエネルギー代謝、循環、呼吸及び生殖など生体にとって最も基本的な機能を調節する神経系である自律神経は、アドレナリン作動性とコリン作動性に分類される。交感神経の節後繊維以外のすべての自律神経繊維、運動神経繊維、交感神経のうち汗腺・血管拡張繊維はコリン作動性神経であり、運動・自律神経機能に重要である。脳にも存在するコリン作動性神経は、脳の認知機能に重要であり、アルツハイマー病では変性することが知られている。また、コリン作動性神経では、コリン生合成能を欠いているため、アセチルコリン分解産物のコリンはシナプス前部に存在する高親和性コリントランスポーターによって細胞内に取り込まれ、アセチルコリン合成に再利用される。この高親和性コリンの取り込みはアセチルコリン合成の律速段階であり、シナプス伝達の効率を調節すると考えられている (J. Neurochem. 18, 781-798, 1971、Science 178, 626-628, 1972、Biochem. Biophys. Acta 291, 564-575, 1973、Mol. Pharmacol. 9, 630-639, 1973、J. Pharmacol. Exp. Ther. 192, 86-94, 1975、J. Neurochem. 30, 15-21, 1978、J. Neurochem. 44, 11-24, 1985、J. Neurochem. 60, 1191-1201, 1993、J. Neurochem. 20, 581-593, 1973、Eur. J.

Pharmacol. 102, 369-370, 1984)。従来、主要な神経伝達物質トランスポーターのほとんどの cDNA は単離されているが、生理的に重要である高親和性コリントランスポーターの cDNA は同定されていない。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

コリン作動性神経に局在し、アセチルコリンの前駆体であるコリンを細胞内に取り込む作用をするタンパク質の存在がこれまでに予想されており、このタンパク質である高親和性コリントランスポーターの分子的性質は不明であった。本発明の課題は、生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらを利用した高親和性コリントランスポーター活性促進物質のスクリーニング方法等を提供することにある。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究し、ゲノム・プロジェクトの情報 (Science 282, 2012-2018, 1998) を利用して、線虫 (*C. elegans*) のゲノム配列から予測される  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーター cDNA を 1 つひとつクローニングし、そのそれぞれについてアフリカツメガエルの卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることにより、線虫高親和性コリントランスポーターの cDNA (*cho-1*) を同定し、この cDNA との塩基配列の相同性を指標にラット脊髄から相同分子 (CHT1) をクローニングした。この CHT1 は神経伝達物質トランスポーター (J. Neurochem. 71, 1785-1803, 1998) との相同性をもたないが、 $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーに属する分子 (Nature 330, 379-381, 1987) に対して 20-25% の相同性を有していた。

#### 【0005】

ノザン解析の結果、脊髄、前脳基底部、線条体、脳幹に局限して CHT1 の転写産物が確認され、CHT1 はコリン作動性神経で発現していると考えられたので、CHT1 をアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させると、 $\text{Na}^+$  依存的で、ヘミコリニウム-3 で完全に阻害されるコリン取り込み活性が観察された。こ

これらの結果から、C H T 1 が高親和性コリントランスポーター活性を有することを見い出した。また、本発明者らは、ヒト及びマウス由来のコリントランスポーター c D N A をクローニングし、その塩基配列を決定し、その発現産物が高親和性コリン取り込み活性を有することを確認した。本発明は以上のようにして完成するに至ったものである。

## 【 0 0 0 6 】

すなわち本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子（請求項 1）や、以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子（a）配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（b）配列番号 2 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 2）や、配列番号 1 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む D N A （請求項 3）や、請求項 3 記載の遺伝子を構成する D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする線虫由来の D N A （請求項 4）や、以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子（a）配列番号 4 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（b）配列番号 4 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 5）や、配列番号 3 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含む D N A （請求項 6）や、請求項 6 記載の遺伝子を構成する D N A とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするラット由来の D N A （請求項 7）や、以下の（a）又は（b）のタンパク質をコードする遺伝子（a）配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（b）配列番号 6 に示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項 8）や、配列番号 5 に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全

部を含むDNA（請求項9）や、請求項9記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするヒト由来のDNA（請求項10）や、以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードする遺伝子(a)配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質(b)配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項11）や、配列番号7に示される塩基配列又はその相補的配列並びにこれらの配列の一部または全部を含むDNA（請求項12）や、請求項12記載の遺伝子を構成するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするマウス由来のDNA（請求項13）に関する。

## 【0007】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項14）や、配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項15）や、配列番号2に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項16）や、配列番号4に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項17）や、配列番号4に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項18）や、配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項19）や、配列番号6に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項20）や、配列番号8に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（請求項21）や、配列番号8に示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質（請求項22）に関する。

## 【0008】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質と、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質（請求項23）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項15又は16記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質（請求項24）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項17又は18記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質（請求項25）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項19又は20記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質（請求項26）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項21又は22記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項23記載の融合タンパク質（請求項27）に関する。

## 【0009】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体（請求項28）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項15又は16記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項28記載の抗体（請求項29）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項17又は18記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項28記載の抗体（請求項30）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項19又は20記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項28記載の抗体（請求項31）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項21又は22記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項28記載の抗体（請求項32）や、抗体がモノクローナル抗体であることを特徴

とする請求項 28～32 のいずれか記載の抗体（請求項 33）に関する。

【0010】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞（請求項 34）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞（請求項 35）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞（請求項 36）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞（請求項 37）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 21 又は 22 記載のマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 34 記載の宿主細胞（請求項 38）に関する。

【0011】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現することを特徴とする非ヒト動物（請求項 39）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 15 又は 16 記載の線虫高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物（請求項 40）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 17 又は 18 記載のラット高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物（請求項 41）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 19 又は 20 記載のヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 39 記載の非ヒト動物（請求項 42）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、請求項 21 又は 22 記載のマウス高親



和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質であることを特徴とする請求項 3 9 記載の非ヒト動物（請求項 4 3）や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項 3 9 ～ 4 3 のいずれか記載の非ヒト動物（請求項 4 4）に関する。

【0 0 1 2】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか記載の遺伝子又は DNA を導入することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法（請求項 4 5）や、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞が、請求項 8 ～ 1 0 のいずれか記載の遺伝子又は DNA が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞であることを特徴とする請求項 4 5 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法（請求項 4 6）や、請求項 4 5 又は 4 6 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞の調製方法により得られることを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞（請求項 4 7）に関する。

【0 0 1 3】

また本発明は、被検物質の存在下、請求項 1 4 ～ 2 2 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 4 8）や、被検物質の存在下、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、該細胞膜又は該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 4 9）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞が、請求項 3 4 ～ 3 8 のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができ

る発現系を含んでなる宿主細胞又は請求項47記載の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞であることを特徴とする請求項49記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項50）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が、組換えタンパク質であることを特徴とする請求項48～50のいずれか記載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項51）や、被検物質の存在下、請求項39～44のいずれか記載の非ヒト動物から得られた細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項52）や、被検物質を非ヒト動物に投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項53）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項54）や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現した非ヒト動物に被検物質を投与し、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を野生型非ヒト動物の場合と比較・評価することを特徴とする高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項55）や、非ヒト動物が、マウス又はラットであることを特徴とする請求項52～55のいずれか記

載の高親和性コリントランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質のスクリーニング方法（請求項 56）に関する。

【0014】

また本発明は、請求項 48～56 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質（請求項 57）や、請求項 48～56 のいずれか記載のスクリーニング方法により得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質（請求項 58）や、高親和性コリントランスポーターの活性増加又は発現増強を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 14～22 のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項 57 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質を含んでなる医薬組成物（請求項 59）や、高親和性コリントランスポーターの活性又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として請求項 14～22 のいずれか記載のタンパク質及び／又は請求項 58 記載の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物（請求項 60）に関する。

【0015】

また本発明は、検体中の高親和性コリントランスポーターをコードする DNA 配列を、請求項 19 又は 20 記載のタンパク質をコードする DNA 配列と比較することを特徴とする高親和性コリントランスポーターの発現又は活性と関連する疾病の診断方法（請求項 61）や、請求項 19 又は 20 記載のタンパク質をコードする DNA 又は RNA のアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアルツハイマー症の診断用プローブ（請求項 62）や、請求項 62 記載の診断用プローブ及び／又は請求項 28～33 のいずれか記載の抗体を含有することを特徴とするアルツハイマー症の診断薬（請求項 63）に関する。

【0016】

【発明の実施の形態】

本発明の配列番号1に記載される線虫高親和性コリントランスポーターのcDNAは、*C. elegans*ゲノム・プロジェクトから $\text{Na}^+$ 依存性トランスポーターファミリーのメンバーと予測される完全長の候補cDNAから調製したそれぞれのcRNAを、アフリカツメガエル卵母細胞に注入し高親和性コリン取り込みを調べることにより得ることができる。その際、哺乳類の脳シナプトソームでは高親和性コリン取り込みは $1\text{ }\mu\text{M}$ のHC3で完全に阻害される( $K_i = 10-100\text{ nM}$ )のに対し、あらゆる細胞に分布している低親和性コリン取り込みはより高濃度のHC3でのみ阻害される( $K_i = 50\text{ }\mu\text{M}$ )ことから、 $1\text{ }\mu\text{M}$ のヘミコリニウム-3 (hemicholinium-3; HC3) に対する感受性を高親和性コリン取り込みの判断基準とすることができる。例えば、以下のようにして線虫(*C. elegans*)の候補cDNAから目的とする遺伝子の同定、発現、局在を確かめることができる。

## 【0017】

高親和性コリン取り込みにおいて、C48D1.3と予測された遺伝子に相当するcDNAは $1\text{ }\mu\text{M}$ のHC3で阻害される有意なコリン取り込みを促すことが分かった。図1には、C48D1.3 cRNAまたは水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の $[^3\text{H}]$ コリンの取り込み結果が示されている。図1中、黒と白のカラムは $1\text{ }\mu\text{M}$ のHC3の非存在下、存在下でのコリン取り込みをそれぞれ示し、それぞれのカラムは平均 $\pm$ SEM ( $n = 6 \sim 8$  卵母細胞)で表示されている。また図2には、 $\text{Na}^+$ のコリン取り込みに対する効果が示され、黒カラムは標準溶液中で測定したコリン取り込みを示し( $[\text{Na}^+] = 100\text{ mM}$ )、白カラムは $\text{Na}^+$ 非存在下でのコリン取り込みを示している( $\text{Na}^+$ は $\text{Li}^+$ に置き換えられた)。さらに図3にはHC3によるコリン取り込みの阻害が示されている。かかる図2, 3から、この取り込みは $\text{Na}^+$ 依存性であり、HC3の $K_i$ は $50\text{ nM}$ と推定された。このcDNAクローンはcho-1 (high-affinity choline transporter-1)と名付けられた。

## 【0018】

cDNAとゲノムの塩基配列の比較により、cho-1遺伝子は9つのエクソンからなることが分かった。cho-1のcDNAの塩基配列から予想されるタ

ンパク質は576アミノ酸残基であり(図4参照)、この配列番号2に示されるタンパク質は常法により作製することができる。また、入手できるデータベースを検索したところcho-1のアミノ酸配列は $\text{Na}^+$ 依存性グルコーストランスポーターファミリーのメンバーに対して弱いながら有意な相同性を示した。疎水性分析と他のトランスポーターとの比較から12回膜貫通領域をもつことが示唆される(図7参照)。

#### 【0019】

次に、線虫(*C.elegans*)の神経系でcho-1を発現している細胞を同定するために、cho-1遺伝子上流5.1kbの領域を融合させたグリーン蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を線虫に導入し、cho-1::gfpを発現している神経細胞の分布を調べた。cho-1::gfpレポーターDNAを染色体外に保持しているL1幼虫の写真を図5として示す(スケールバー; 50  $\mu\text{m}$ )。図5中、矢頭は神経環を示す。腹部神経索ではGFPはコリン作動性運動神経においてのみ発現しているが、おそらく染色体外のレポーターDNAが欠失したためにいくつかのDA、DB神経細胞はGFPを発現していない。これはcho-1がコリン作動性神経の高親和性コリントランスポーターであることを裏付けている。

#### 【0020】

本発明の配列番号3に記載されるラット高親和性コリントランスポーターのcDNAは、例えば次のようにして調製することができる。脊椎動物のcho-1相同分子に注目し、cho-1から予想されるアミノ酸配列でデータベースを検索し、ヒトのgenomic survey sequence(GSS)で一つの候補(GenBank accession number: AQ316435)を同定した。このヒトのゲノムDNAとcho-1の塩基配列の相同性に基づき、縮重プライマーを用いたPCRでラット脊髄cDNAからcDNA断片を増幅した。この断片を使ってラット脊髄cDNAライブラリーをスクリーニングし陽性のcDNAクローンを得た。最長の読み枠の塩基配列からcho-1と51%の同一性および70%の類似性を示す580アミノ酸残基のタンパク質が予想された(図4参照)。このラットcDNAクローンはCHT1と名付けられた。図4には、ラットCHT1と線虫CHO-1のそれぞれのアミノ酸配列が、同一残基は黒囲みで、類似残基はグレー囲みで表示されてい

る。予想される膜貫通領域 I-XII は下線が引かれている。この配列番号 4 で示されるタンパク質は常法により作製することができる。

#### 【0021】

上記 CHT 1 のアミノ酸配列は  $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーのメンバーと有意な相同性を有する (20-25%)。遺伝研究所 (三島、日本) のプログラム CLUSTALW を用いて neighbor-joining 法で作製した  $\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーの系統樹を図 6 に示す。図 6 には、ラット CHT 1 に対してそれぞれのタンパク質が含む同一のアミノ酸の割合 % が右側に示されている。一方、酵母のコリントランスポーター (J. Biol. Chem. 265, 15996-16003, 1990)、当初は高親和性コリントランスポーターと報告されていたクレアチントランスポーター (Biochem. Biophys. Res. Commun. 198, 637-645, 1994)、及び他の神経伝達物質トランスポーターとは相同性をもたない。

#### 【0022】

CHT 1 の予想されるトポロジーは線虫 CHO-1 と本質的に同じであると考えられ、ラット CHT 1 の予想されるトポロジーを図 7 に示す。図 7 中、黒の円は同一残基、グレーの円はよく保存された残基、白の円は類似していない残基を示す。枝線は予想される糖鎖付加部位を示す。円中の P はタンパク質キナーゼ C によるリン酸化予想部位を示す。

#### 【0023】

次に、ノザン解析や in situ ハイブリダイゼーションで CHT 1 の mRNA の発現分布を調べた。ラットのさまざまな組織のノザン解析からおよそ 5 kb の長さの転写産物の発現を確認した。図 8 には、ラット組織での CHT 1 の mRNA 転写産物のノザン解析の結果が示されている。また、RNA の標準 (0.24-9.5 kb; GIBCO BRL) の長さが左に示されている。図 8 からわかるように、前脳基底部や脳幹、脊髄で多く、線条体では少なかった。これらの組織はいずれもコリン作動性神経を含むことが知られている。一方、脳の他の領域や非神経系の組織では転写産物は確認されなかった。

#### 【0024】

これらの結果と一致して、*in situ* ハイブリダイゼーションでは線条体、前脳基底部の細胞群、脊髄前角を含む主要なコリン作動性神経の細胞集団で CHT 1 の mRNA の発現が確認された。図 9 及び図 10 (スケールバー; 1 mm) には、ラット脳及び脊髄における CHT 1 転写産物の *in situ* ハイブリダイゼーション解析に関する、ジゴキシゲニンでラベルされたアンチセンスの cRNA プローブにハイブリダイズされた明視野での切片の顕微鏡写真が図示されている。図 9 から、CHT 1 の mRNA 転写産物は vertical 及び horizontal limbs of the diagonal band (VDB, HDB), medial septal nucleus (MS), caudate and putamen (CPu), olfactory tubercle (Tu) で検出されていることが、図 10 から脊髄では前角 (VH) で発現が観察されることがわかる。また、小胞アセチルコリントランスポーターのプローブでハイブリダイズされた隣の切片も本質的に同様な分布を示した。この発現分布はすでに報告されているコリンアセチル基転移酵素や小胞アセチルコリントランスポーターの分布と本質的に同じである。これらの結果は CHT 1 の mRNA がコリン作動性神経に局限して発現していることを示している。

#### 【0025】

次に CHT 1 によるコリン取り込みをアフリカツメガエル卵母細胞で調べた。CHT 1 の cRNA を注入した卵母細胞のコリン取り込みは水を注入したコントロールよりも 2-4 倍高かった。図 11 には、CHT 1 の cRNA または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コリンの取り込み結果が示されている。図 11 中、黒と白のカラムは 100 mM の NaCl あるいは LiCl を含む標準溶液でのコリン取り込みをそれぞれ示し、それぞれのカラムは平均  $\pm$  SEM ( $n = 6 \sim 8$  卵母細胞) で表示されている。またコリン濃度のコリン取り込みに対する効果が図 12 に示されている。図 12 においては、水を注入した卵母細胞の取り込みを cRNA のそれから差し引いて、CHT 1 によるコリン取り込みを算出し、取り込みはミカエリス・メンテンの曲線に近似させている。図 12 に示されるように、CHT 1 のコリン取り込みはコリン濃度を増加させると飽和した ( $K_m = 2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ,  $n = 3$ )。

#### 【0026】

次に、HC3によるコリン取り込みの阻害の結果を図13に示す。図13から、コントロールの内因性のコリン取り込みの $K_m$ は $10\text{ }\mu\text{M}$ より高く、CHT1のコリン取り込みは $0.1\text{ }\mu\text{M}$ のHC3で完全に阻害される( $K_i = 2-3\text{ nM}$ )のに対して、コントロールでは $10\text{ }\mu\text{M}$ のHC3でわずかしき阻害されないことがわかる。図14に示されるように、CHT1のコリン取り込みのイオン依存性を調べると $\text{Na}^+$ だけでなく $\text{Cl}^-$ 依存的事であることがわかった。黒と白のカラムは水を注入した卵母細胞のコリン取り込み、cRNAを注入した卵母細胞のコリン取り込みをそれぞれ示す(標準溶液中の $100\text{ mM}$ の $\text{NaCl}$ は図で示されているそれぞれの $100\text{ mM}$ の塩で置換)。これらの結果は脳シナプトソームの高親和性コリン取り込みから期待される特性(コリンに対する高い親和性、HC3に対する高い感受性、 $\text{Na}^+-\text{Cl}^-$ 依存性)をCHT1がもつことを示している(J. Neurochem. 27, 93-99, 1976)。

## 【0027】

また、CHT1のcDNAとベクター(コントロール)をそれぞれ導入したCOS7細胞から調製した膜の $[^3\text{H}]$ HC3結合活性を調べた。結果を図15に示す。図15からわかるように、CHT1を発現させた細胞の膜では $\text{Na}^+$ 依存的な $[^3\text{H}]$ HC3結合が観察されたが、コントロールの膜では観察されなかった。次に、特異的 $[^3\text{H}]$ HC3結合の飽和解析を行った。図16に示されるように、平衡解離定数( $K_d$ )は $1.6 \pm 0.2\text{ }\mu\text{M}$ ( $n=3$ )であると推定された。この値は脳シナプトソームで報告されている数値と類似していた(J. Neurochem. 60, 1191-1201, 1993, Life Sci. 35, 2335-2343, 1984, Brain Res. 348, 321-330, 1985)。さらに、HC3、コリン(Cho)、アセチルコリン(Ach)による特異的 $[^3\text{H}]$ HC3結合の置換について検討した。アセチルコリンは $1\text{ }\mu\text{M}$ フィソスチグミン存在下で測定した。結果を図17に示す。図17から、 $[^3\text{H}]$ HC3の特異的結合はアセチルコリンよりも約10倍以上低い濃度で置換されることがわかる。これらの結果はCHT1が高親和性コリントランスポーターであるだけでなくHC3結合部位でもあることを示している。

## 【0028】

本発明の配列番号5に記載されるヒト高親和性コリントランスポーターのcD



NAは、例えば次のようにして調製することができる。線虫 (*C. elegans*) CHO-1 のアミノ酸配列でデータベース検索を行い、有意な相同性がある特定のヒトゲノムDNA断片の配列 (human genomic survey sequenceの1クローンであるR-107P12; GenBank accession number: AQ316435) を見出し、かかるDNA断片の塩基配列を基にPCRの遺伝子特異的プライマーを設計した。ヒト全脳のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNA (クローンテック社製) と付属のアダプタープライマーを用いて5' - RACE (rapid amplification of cDNA ends) 及び3' - RACEを行った。この得られたPCR産物をPCR用クローニングベクターにクローン化し、挿入DNAの塩基配列を決定した。また、このDNA配列から予想されるアミノ酸配列は配列番号6で示されている。かかる配列番号6で示されるヒト高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、配列番号5に示されるDNA配列情報に基づいて常法により作製することができる。

## 【0029】

本発明の配列番号7に記載されるマウス高親和性コリントランスポーターのcDNAは、例えば次のようにして調製することができる。線虫 (*C. elegans*) CHO-1 のアミノ酸配列でデータベース検索を行い、有意な相同性がある特定のヒトゲノムDNA断片の配列 (human genomic survey sequenceの1クローンであるR-107P12; GenBank accession number: AQ316435) を見出し、かかるDNA断片の塩基配列を基にPCRの遺伝子特異的プライマーを設計した。マウス全脳のMarathon-Ready<sup>TM</sup> cDNA (クローンテック社製) と付属のアダプタープライマーを用いて5' - RACE (rapid amplification of cDNA ends) 及び3' - RACEを行った。この得られたPCR産物をPCR用クローニングベクターにクローン化し、挿入DNAの塩基配列を決定した。また、このDNA配列から予想されるアミノ酸配列は配列番号8で示されている。かかる配列番号8で示されるマウス高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、配列番号7に示されるDNA配列情報に基づいて常法により作製することができる。

## 【0030】

本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質としては、

天然由来のタンパク質であっても組換えタンパク質であってもよく、上記具体的に開示した配列番号 2、4、6 及び 8 で示されるものの他に、配列番号 2、4、6 及び 8 で示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質も包含され、これらは公知の方法で調製することができる。また、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又は DNA としては、上記具体的に開示された配列番号 1、3、5 及び 7 で示されるものの他に、配列番号 2、4、6 及び 8 で示されるアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又は DNA や、これら遺伝子又は DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする DNA も包含され、これらは公知の方法で調製することができる。

#### 【0031】

ところで、コリン作動性神経は学習・記憶に非常に重要な役割を果たしている。この神経の障害と痴呆の重篤さは相関する。アセチルコリン合成の律速段階は高親和性コリン取り込みであり、その活性は神経活動や種々の刺激で制御されている。さらにアルツハイマー病患者の脳では高親和性コリン取り込みや HC 3 結合活性が亢進している (Trends Neurosci. 15, 117-122, 1992, Ann. NY Acad. Sci. 777, 197-204, 1996, J. Neurochem. 69, 2441-2451, 1997)。上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又は DNA や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のクローニングはこれらの制御の分子機構を明らかにしたり、アルツハイマー病の新しい療法を開発したりするために重要である。

#### 【0032】

本発明の融合タンパク質とは、線虫、ラット、ヒト、マウス等の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に、マーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させたものをいい、マーカータンパク質としては、従来知

られているマーカータンパク質であればどのようなものでもよく、例えば、アルカリフォスファターゼ、抗体のFc領域、HRP、GFPなどを具体的に挙げる  
ことができ、また本発明におけるペプチドタグとしては、Mycタグ、Hisタグ、FLAGタグ、GSTタグなどの従来知られているペプチドタグを具体的に  
例示することができる。かかる融合タンパク質は、常法により作製することがで  
き、Ni-NTAとHisタグの親和性を利用した高親和性コリントランスポー  
ター活性を有するタンパク質の精製や、高親和性コリントランスポーター活性を  
有するタンパク質の検出や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタン  
パク質に対する抗体の定量、アルツハイマー症の診断用マーカーなどとして、ま  
た当該分野の研究用試薬としても有用である。

## 【0033】

本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に  
結合する抗体としては、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体  
、一本鎖抗体、ヒト化抗体等の免疫特異的な抗体を具体的に挙げる  
ことができ、これらは上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を抗原と  
して用いて常法により作製することができるが、その中でもモノクローナル抗体  
がその特異性の点でより好ましい。かかるモノクローナル抗体等の高親和性コリ  
ントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体は、例えば  
、アルツハイマー症の診断や高親和性コリントランスポーターの制御の分子機構  
を明らかにする上で有用である。

## 【0034】

高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体は、慣  
用のプロトコルを用いて、動物（好ましくはヒト以外）に該高親和性コリント  
ランスポーター活性を有するタンパク質若しくはエピトープを含む断片、又は該  
タンパク質を膜表面に発現した細胞を投与することにより産生され、例えばモノ  
クローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたら  
す、ハイブリドーマ法（Nature 256, 495-497, 1975）、トリオーマ法、ヒトB  
細胞ハイブリドーマ法（Immunology Today 4, 72, 1983）及びEBV-ハイブリ  
ドーマ法（MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Lis

s, Inc., 1985) など任意の方法を用いることができる。

【0035】

本発明の上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する一本鎖抗体をつくるために、一本鎖抗体の調製法（米国特許第4,946,778号）を適用することができる。また、ヒト化抗体を発現させるために、トランスジェニックマウス又は他の哺乳動物等を利用したり、上記抗体を用いて、その高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現するクローンを単離・同定したり、アフィニティークロマトグラフィーでそのポリペプチドを精製することもできる。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体は、とりわけ、アルツハイマー症等の診断や治療に使用できる可能性がある。

【0036】

本発明はまた、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞に関する。かかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の宿主細胞への導入は、Davisら（BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1986）及びSambr ookら（MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989）などの多くの標準的な実験室マニュアルに記載される方法、例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、トランスベクション(transvection)、マイクロインジェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング (scrape loading)、弾丸導入(ballistic introduction)、感染等により行うことができる。そして、宿主細胞としては、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌、ストレプトコッカス、スタフィロコッカス等の細菌原核細胞や、酵母、アスペルギルス等の真菌細胞や、ドロソフィラ S 2、スポドプテラ S f 9 等の昆虫細胞や、L細胞、CHO細胞、COS細胞、HeLa細胞、C127細胞、BALB/c 3T3細胞（ジヒドロ葉酸レダクターゼやチミジンキナーゼなどを欠損した変異株を含む）、BHK21細胞、HEK293細胞、Bowesメラノーマ細胞等

の動物細胞や、植物細胞等を挙げることができる。

【0037】

また、発現系としては、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよく、染色体、エピソーム及びウイルスに由来する発現系、例えば、細菌プラスミド由来、酵母プラスミド由来、SV40のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由来のベクター、バクテリオファージ由来、トランスポゾン由来及びこれらの組合せに由来するベクター、例えば、コスミドやファージミドのようなプラスミドとバクテリオファージの遺伝的要素に由来するものを挙げることができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

【0038】

上記発現系を含んでなる宿主細胞やかかる細胞の細胞膜、またかかる細胞を培養して得られる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、後述するように本発明のスクリーニング方法に用いることができる。例えば、細胞膜を得る方法としては、F. Pietri-Rouxel (Eur. J. Biochem., 247, 1174-1179, 1997) らの方法などを用いることができ、また、かかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を細胞培養物から回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法、好ましくは、高速液体クロマトグラフィーが用いられる。特に、アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、抗高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質抗体を結合させたカラムや、上記高親和性コリントランスポーターに通常のペプチドタグを付加した場合は、このペプチドタグに親和性のある物質を結合したカラムを用いることにより、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を得ることができる。

## 【0039】

本発明において、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した非ヒト動物とは、染色体上の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の一部若しくは全部が破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により不活性化され、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現する機能を失なった非ヒト動物をいい、また、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で過剰発現する非ヒト動物とは、野生型非ヒト動物に比べてかかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を大量に産生する非ヒト動物をいう。そして、本発明における非ヒト動物としては、マウス、ラット等の齧歯目動物などの非ヒト動物を具体的に挙げることができるが、これらに限定されるものではない。

## 【0040】

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型又は過剰発現型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、すなわち高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物と同種の動物、さらには同腹の動物を、例えば下記に記載する本発明のスクリーニングに際して併用することが好ましい。かかる高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物の作製方法を、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のノックアウトマウスやトランスジェニックマウスを例にとって以下説明する。

## 【0041】

例えば、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損したマウス、すなわち高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質ノックアウトマウスは、マウス遺伝子ライブラリ

ーからPCR等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をスクリーニングし、スクリーニングされた高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNAシーケンシングにより特定する。このクローンの高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の全部又は一部をpMC1ネオ遺伝子カセット等に置換し、3'末端側にジフテリアトキシンAフラグメント(DT-A)遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ(HSV-tk)遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

#### 【0042】

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション(電気穿孔)法等によってES細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418やガンシクロピア(GANC)等の抗生物質により相同的組換えを起こしたES細胞を選択する。また、この選択されたES細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンブロット法等により確認することが好ましい。その確認されたES細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型のマウスとインタークロスさせると、ヘテロ接合体マウスを得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスをインタークロスさせることによって、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質ノックアウトマウスを作製することができる。また、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質ノックアウトマウスが生起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスからRNAを単離してノーザンブロット法等により調べたり、またこのマウスの発現をウェスタンブロット法等により調べる方法がある。

#### 【0043】

高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のトランスジェニックマウスは、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするcDNAにチキン $\beta$ -アクチン、マウスニューロフィラメント、SV40等

のプロモーター、及びラビット $\beta$ -グロビン、SV40等のポリA又はイントロンを融合させて導入遺伝子を構築し、該導入遺伝子をマウス受精卵の前核にマイクロインジェクションし、得られた卵細胞を培養した後、仮親のマウスの輸卵管に移植し、その後被移植動物を飼育し、産まれた仔マウスから前記cDNAを有する仔マウスを選択することによりかかるトランスジェニックマウスを創製することができる。また、cDNAを有する仔マウスの選択は、マウスの尻尾等より粗DNAを抽出し、導入した高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子をプローブとするドットハイブリダイゼーション法や、特異的プライマーを用いたPCR法等により行うことができる。

## 【0044】

また、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子又はDNAの全部あるいは一部を用いると、アルツハイマー症等の遺伝子治療に有効な細胞を調製することができる。本発明におけるこれら細胞の調製方法としては、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損した細胞に、上記本発明の遺伝子又はDNAの全部あるいは一部をトランスフェクション等により導入し、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞を得る方法を挙げることができ、特に、かかる高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞としては、上記遺伝子又はDNA等が染色体にインテグレートされ、ステイブルに高親和性コリントランスポーター活性を示す細胞を用いることが好ましい。

## 【0045】

また、上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子若しくはDNA、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質とマーカータンパク質及び／又はペプチドタグとを結合させた融合タンパク質、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に対する抗体、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞、高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞等を用いると、アルツハイマー症等のような症状の治療に有用な薬剤、すなわち高親和性コリン



トランスポーター活性促進若しくは抑制物質又は高親和性コリントランスポーター発現促進若しくは抑制物質をスクリーニングすることができる。

【0046】

本発明におけるスクリーニング方法としては、被検物質の存在下、上記本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の高親和性コリントランスポーター活性を測定・評価する方法や、被検物質の存在下、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現している細胞膜又は細胞をインビトロで培養し、該細胞における高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価する方法や、前記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物及び／又は野生型非ヒト動物に被検物質を投与し、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性及び／又は発現量を測定・評価する方法等を挙げることができる。上記細胞膜又は細胞としては、前記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子機能が染色体上で欠損又は過剰発現する非ヒト動物又は野生型非ヒト動物などから得られる初代培養した細胞などの細胞や、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を発現することができる発現系を含んでなる宿主細胞や、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有する細胞や、これら細胞の細胞膜などを具体的に例示することができる。

【0047】

上記被検物質と高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質とを用いたスクリーニング方法について、以下に具体的に例を挙げて説明するが、本発明のスクリーニング方法はこれらに限定されるものではない。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質発現細胞を被検物質の存在下で培養し、一定時間培養後細胞膜表面に発現された高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質が減少又は増加したことを、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体を用いて、ELISA等による免疫化学的に検出して、あるいはmRNAの発現が抑制又は促進した

ことを指標として評価することができる。また、かかるmRNAの検出法は、DNAチップ、ノーザンハイブリダイゼーション等の方法で行なうことができる他、高親和性コリントランスポーターをコードする遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼなどのレポーター遺伝子をつないだ遺伝子を導入した細胞を用いると、被検物質による高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の発現抑制又は促進は、前記レポーター遺伝子の活性を指標に検出することが可能である。

## 【0048】

また本発明は、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性又は発現の促進を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性又は発現の抑制を必要としている患者を治療するのに用いられる医薬組成物であって、有効成分として高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質や、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質又は高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を抑制する物質を含んでなる医薬組成物に関する。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質は、多くの病理を含めて多数の生物学的機能に参与していることから、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質を刺激し得る化合物や、その機能を阻害し得る化合物は医薬としての用途が期待できる。

## 【0049】

上記高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進又は抑制する物質としては、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に結合して、あるいは上流のシグナル伝達分子に作用して、単独で高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性若しくは発現を促進する物質又はその活性若しくは発現を阻害・拮抗する物質であればどのようなものでもよく、例えば、抗体、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質のリガンド、このタンパク質の断片及び断片をコードするオリゴヌクレオチド等を具体的に挙げることができ、またこれらはアルツハイマー疾等

のような症状の治療及び予防目的等の医薬として使用することができるが、これらの用途に限定されるものではない。

【0050】

本発明はまた、検体中の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA配列を、本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA配列と比較することからなる、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の活性又は発現と関連する疾病の診断方法に関する。高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNAの変異型の検出は、遺伝子に変異がある個体をDNAレベルで見い出すことにより行うことができ、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質の過少発現、過剰発現又は変異発現により生ずる疾病の診断に有効である。かかる検出に用いられる検体としては、被験者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織等の生検から得ることができるゲノムDNAや、RNA又はcDNAを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものではなく、かかる検体を使用する場合、PCR等により増幅したものを用いてもよい。そして、塩基配列の欠失や挿入変異は、正常な遺伝子型と比較したときの増幅産物のサイズの変化により検出でき、また点突然変異は増幅DNAを標識高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子とハイブリダイズさせることで同定することができる。このように、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の変異を検出することで、アルツハイマー疾等のような症状の診断又は判定をすることができる。

【0051】

本発明はまた、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA又はRNAのアンチセンス鎖の全部又は一部からなるアルツハイマー症等のような症状の疾患の診断用プローブ、及び当該プローブ及び／又は本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体を含有してなるアルツハイマー疾等のような症状の疾患の診断薬に関する。前記診断用プローブとしては、高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質をコードするDNA (cDNA) 又はRNA (cRNA) のアンチ

センス鎖の全部又は一部であり、プローブとして成立する程度の長さ（少なくとも20ベース以上）を有するものであれば特に制限されるものではない。かかるプローブ及び／又は本発明の高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質に特異的に結合する抗体をアルツハイマー症等のような症状の診断薬の有効成分とするためには、プローブが分解されないような適当なバッファー類や滅菌水に溶解することが好ましい。また、これらの診断薬を用いた、免疫染色法（Dev. Biol. 170, 207-222, 1995、J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996）や、In situ ハイブリダイゼーション法（J. Neurobiol. 29, 1-17, 1996）や、in situ PCR法等の方法によりアルツハイマー症等のような症状の疾患を診断することもできる。

#### 【0052】

以下上記の各種実験における実験方法等をさらに詳細に説明する。

（高親和性コリントランスポーター cDNA のクローニング）

線虫高親和性コリントランスポーターの候補の cDNA は、種々の発生段階の線虫混合物の poly(A)+RNA から逆転写 PCR 及び 3' RACE で単離した。プロトコールに従って Marathon<sup>TM</sup> cDNA Amplification Kit（クローンテック社製）を用いた。PCR の順方向のプライマーは C. elegans ゲノム・プロジェクトから入手した DNA 塩基配列に基いて、予測遺伝子の暫定的な翻訳開始点で設計した。増幅された PCR 産物を改変 pSPUTK ベクター（ストラタジーン社製）の Nco I（平滑化）部位と Not I 部位にサブクローニングし、挿入 DNA の塩基配列を決定した。ラットの CHT1 cDNA は GeneTrapper cDNA Positive Selection System（ギブコバイオラッドラボレトリー：GIBCO BRL）をプロトコール通りに使用してラット脊髄 cDNA ライブラリーから単離した。用いたプライマーは縮重 PCR で得られた cDNA 断片の塩基配列から設計した。得られた cDNA クローンを解析した結果陽性だったクローンを pSPUTK ベクター及び pcDNA3.1+ ベクター（インビトロジェン社製）にサブクローニングした。

#### 【0053】

（アフリカツメガエル卵母細胞での発現）

cRNA はキャップアナログ存在下で SP6 または T7 RNA ポリメラーゼを

用いてインビトロで合成した。キャップ化RNA 20-30 ngをアフリカツメガエル卵母細胞（ステージV-VI）に微量注入した。取り込み測定は文献（Nature 360, 467-471, 1992）に述べられている方法と本質的に同様に行った。コリン取り込みはRNA注入の2-3日後に0.75 mlの標準液中（0.01-1  $\mu$ Mの [ $^3$ H]-コリン、100 mMのNaCl、2 mMのKCl、1 mMのMgCl<sub>2</sub>、1 mMのCaCl<sub>2</sub>、10 mMのHEPES、5 mMのTris : pH 7.4）の卵母細胞（6-8個）を用いて30-60分間行った。取り込み後の卵母細胞は10%のSDSで可溶化して、液体シンチレーションカウンターで [ $^3$ H] 量を測定した。

## 【0054】

（GFC発現コンストラクト）

cho-1::gfpの転写融合コンストラクトは文献（Gene 212, 127-135, 1998）で述べられている方法と同様にPCRで作製した。核移行シグナル配列（NLS）の下流にあるグリーン蛍光タンパク質（GFP）をコードする遺伝子をcho-1翻訳開始点からアミノ酸3残基分下流の位置に読み枠が合うように挿入した。NLSとgfp遺伝子はpPD104.53ベクターから増幅した。cho-1翻訳開始点から5.1 kb上流領域を調製するためにcho-1の最初のアミノ酸3残基分を含むように設計したPCRプライマーを用いた。文献（EMBO J. 10, 3959-3970, 1991）で述べられている方法と同様にrol-6（sul006）マーカーと作製したDNAを線虫の生殖器官に同時注入した。

## 【0055】

（ノザン解析）

ラットのさまざまな組織から調製した6  $\mu$ gのpoly(A)+RNAをホルムアルデヒド-アガロース電気泳動で分離し、ナイロン膜に転写した。次にハイブリダイゼーション溶液（最終濃度で50%のホルムアミド、5 $\times$ SSPE、5 $\times$ Denhardt's solution、0.5%のSDS、100  $\mu$ g/mlのsalmon sperm DNAを含む溶液）中で、ランダム・プライム法で [ $^{32}$ P] ラベルしたCHT1のcDNA断片に対して42℃で16時間ハイブリダイズさせた。ナイロン膜は最終条件（0.1 $\times$ SSPE、0.1%のSDS : 65℃）で洗浄後、エンハンシングスクリ

ーン (enhancing screen) と共に 7 日間オートラジオグラフィーを行った。

【0056】

(in situ ハイブリダイゼーション)

ジゴキシゲニンでラベルしたアンチセンスの転写産物は in vitro で合成した。転写産物は平均長 200~400 塩基対になるまでアルカリ分解を行った。新鮮凍結組織のクリオスタット切片 (10~20  $\mu$ m) を用いた。ハイブリダイゼーションは 1×Denhardt's 溶液 [最終濃度で 50 mM の Tris-HCl (pH 8.0)、2.5 mM の EDTA、0.3 M の NaCl、50% のホルムアミド、10% のデキストランサルフェート、1 mg/ml の大腸菌 (E. coli) の tRNA を含む溶液] に溶解させたラベル化 cRNA プロブ (およそ 1  $\mu$ g/ml) で 45℃ で 20 時間行った。次に切片を 2×SSC/50% のホルムアミド中で 2 回、1×SSC/50% のホルムアミド中で 1 回、いずれも 45℃ で洗浄した。ハイブリダイズしたプロブを抗ジゴキシゲニン Fab 断片 (Boehringer-Mannheim) と NBT/BCIP 基質を用いて可視化した。切片は基質溶液中で 24~48 時間反応させた。

【0057】

(結合実験)

[<sup>3</sup>H] ヘミコリニウム-3 (HC3; 128 Ci/mmol) は NEN Life Science Products から入手した。pcDNA3.1-CHT1 あるいは pcDNA3.1 をそれぞれ COS7 細胞に一過性に発現させた。プロトコールに従って TransFast Reagent (プロメガ社製) を導入し用いた。膜調製は、細胞を 0.32 M スクロース中でホモジュナイズし、200,000 g で 1 時間遠心後、沈澱物を懸濁させた。結合実験は他で述べられている方法と本質的に同様に行った。特異的結合量は 10  $\mu$ M の HC3 存在下で決定した非特異的結合量を全体の結合量から差し引いて計算した。飽和結合実験のデータから特異的な [<sup>3</sup>H] HC3 結合量を非線形近似で解析して K<sub>d</sub> 値を算出した。

【0058】

【発明の効果】

本発明によると、生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を

有するタンパク質、それをコードする遺伝子DNAを提供することができる。また、それらタンパク質や遺伝子DNAを用いることにより、アルツハイマー症の予防や治療に有用な物質をスクリーニングすることや、遺伝子治療に有用な細胞を調製することができる。

【0059】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION

<120> High-Affinity Choline Transporter

<130> A011P15

<140>

<141>

<150> JP P1999-240642

<151> 1999-08-27

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1731

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1731)

<400> 1

atg gcc gac tta ttg ggt atc gtg gcc att gtg ttc ttc tac gtg ctc 48

Met Ala Asp Leu Leu Gly Ile Val Ala Ile Val Phe Phe Tyr Val Leu

1

5

10

15

att ctt gtc gtt gga ata tgg gcg ggt aga aaa tcg aaa agt tca aaa 96

Ile Leu Val Val Gly Ile Trp Ala Gly Arg Lys Ser Lys Ser Ser Lys

20

25

30

gag ctt gaa tca gaa gcc ggc gcg gcg acg gaa gag gtg atg tta gct 144

Glu Leu Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ala Thr Glu Glu Val Met Leu Ala

35

40

45

ggg aga aac atc gga act ctt gtc gga att ttc aca atg act gcc acg 192

Gly Arg Asn Ile Gly Thr Leu Val Gly Ile Phe Thr Met Thr Ala Thr

50

55

60

tgg gtt ggc ggt gct tat atc aat gga acc gcc gag gct ctg tat aat 240

Trp Val Gly Gly Ala Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Leu Tyr Asn

65

70

75

80

gga ggt ctc ctt gga tgt cag gct cca gtt gga tat gca att tcc ctt 288

Gly Gly Leu Leu Gly Cys Gln Ala Pro Val Gly Tyr Ala Ile Ser Leu

85

90

95



gtt atg gga gga cta ctt ttc gca aag aaa atg cga gaa gaa gga tat 336  
Val Met Gly Gly Leu Leu Phe Ala Lys Lys Met Arg Glu Glu Gly Tyr  
100 105 110

att aca atg ctc gat cct ttt cag cac aaa tat ggc caa cga atc ggt 384  
Ile Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln His Lys Tyr Gly Gln Arg Ile Gly  
115 120 125

ggc ttg atg tat gtt cca gca ctt ctt ggt gaa aca ttc tgg aca gca 432  
Gly Leu Met Tyr Val Pro Ala Leu Leu Gly Glu Thr Phe Trp Thr Ala  
130 135 140

gcc att ctt tcg gca ctt ggt gca aca ctg tcg gta att ctt gga atc 480  
Ala Ile Leu Ser Ala Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Ile Leu Gly Ile  
145 150 155 160

gac atg aat gca tca gtg acc ctg tcg gcc tgt att gcc gta ttc tac 528  
Asp Met Asn Ala Ser Val Thr Leu Ser Ala Cys Ile Ala Val Phe Tyr  
165 170 175

aca ttc acc ggt gga tac tat gca gtc gcg tac act gac gtc gtt caa 576  
Thr Phe Thr Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln  
180 185 190

cta ttt tgc att ttc gtc ggt ttg tgg gtt tgc gtg ccg gcg gct atg 624  
Leu Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Val Cys Val Pro Ala Ala Met  
195 200 205

gtg cat gat ggt gcg aag gat att tcc agg aat gca ggc gac tgg att 672

Val His Asp Gly Ala Lys Asp Ile Ser Arg Asn Ala Gly Asp Trp Ile

210

215

220

gga gag att gga gga ttc aaa gaa aca tct ctc tgg att gat tgc atg 720

Gly Glu Ile Gly Gly Phe Lys Glu Thr Ser Leu Trp Ile Asp Cys Met

225

230

235

240

ctt ctc ctt gtc ttt gga gga att cca tgg caa gtg tac ttc caa aga 768

Leu Leu Leu Val Phe Gly Gly Ile Pro Trp Gln Val Tyr Phe Gln Arg

245

250

255

gtt ctc tcc tca aaa act gct cat gga gca cag acg ttg tcg ttt gtg 816

Val Leu Ser Ser Lys Thr Ala His Gly Ala Gln Thr Leu Ser Phe Val

260

265

270

gcg ggc gtc gga tgc att ctc atg gcg att cca cca gcg ttg atc ggt 864

Ala Gly Val Gly Cys Ile Leu Met Ala Ile Pro Pro Ala Leu Ile Gly

275

280

285

gca att gcc agg aac aca gac tgg aga atg act gat tat tcc cca tgg 912

Ala Ile Ala Arg Asn Thr Asp Trp Arg Met Thr Asp Tyr Ser Pro Trp

290

295

300

aac aat gga act aag gtc gaa tcg att cca ccg gat aag aga aac atg 960

Asn Asn Gly Thr Lys Val Glu Ser Ile Pro Pro Asp Lys Arg Asn Met

305

310

315

320

gtg gtc ccg ttg gta ttc cag tat ctt acg cca aga tgg gtc gcc ttt 1008

Val Val Pro Leu Val Phe Gln Tyr Leu Thr Pro Arg Trp Val Ala Phe

325

330

335

att gga ctc ggc gca gtg tgc gct gct gta atg tca tct gca gat tca 1056

Ile Gly Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser

340

345

350

tct gta cta tca gca gca tca atg ttt gct cac aac atc tgg aag ctc 1104

Ser Val Leu Ser Ala Ala Ser Met Phe Ala His Asn Ile Trp Lys Leu

355

360

365

aca att cgc cct cac gcg tct gaa aaa gaa gtg ata att gtg atg aga 1152

Thr Ile Arg Pro His Ala Ser Glu Lys Glu Val Ile Ile Val Met Arg

370

375

380

ata gcc atc atc tgt gtt ggt atc atg gca acc atc atg gca ctt acc 1200

Ile Ala Ile Ile Cys Val Gly Ile Met Ala Thr Ile Met Ala Leu Thr

385

390

395

400

att caa tcc atc tat ggg ctt tgg tat ctt tgt gca gat ttg gtc tac 1248

Ile Gln Ser Ile Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Cys Ala Asp Leu Val Tyr

405

410

415

gtc ata ctc ttc cct caa cta tta tgt gtt gta tat atg cca cgt agc 1296

Val Ile Leu Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Val Tyr Met Pro Arg Ser

420

425

430

aat acg tat ggc tca ttg gct ggc tat gca gtc ggt ctt gtg ctc cgt 1344

Asn Thr Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Tyr Ala Val Gly Leu Val Leu Arg

435

440

445

ttg att gga ggc gag cca ctt gta tcg ctg cca gcg ttc ttc cat tat 1392

Leu Ile Gly Gly Glu Pro Leu Val Ser Leu Pro Ala Phe Phe His Tyr

450

455

460

cca atg tat acg gat ggg gta cag tat ttc cca ttc agg aca act gct 1440

Pro Met Tyr Thr Asp Gly Val Gln Tyr Phe Pro Phe Arg Thr Thr Ala

465

470

475

480

atg tta tct tca atg gct act atc tac att gta tca ata caa tcg gag 1488

Met Leu Ser Ser Met Ala Thr Ile Tyr Ile Val Ser Ile Gln Ser Glu

485

490

495

aag ctg ttc aaa tcg gga cgt ttg tct ccg gag tgg gac gta atg ggt 1536

Lys Leu Phe Lys Ser Gly Arg Leu Ser Pro Glu Trp Asp Val Met Gly

500

505

510

tgt gta gtg aat att ccg ata gat cat gta ccc ctt ccg tca gat gta 1584

Cys Val Val Asn Ile Pro Ile Asp His Val Pro Leu Pro Ser Asp Val

515

520

525

tcg ttt gct gtt agt agt gag acc ttg aat atg aag gct cca aac gga 1632

Ser Phe Ala Val Ser Ser Glu Thr Leu Asn Met Lys Ala Pro Asn Gly

530

535

540

aca ccg gct cca gta cat ccg aac caa cag ccg tct gat gaa aat aca 1680

Thr Pro Ala Pro Val His Pro Asn Gln Gln Pro Ser Asp Glu Asn Thr

545

550

555

560

tta tta cat cca tat tcg gac caa agt tat tat tcc aca aat agc aat 1728  
 Leu Leu His Pro Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Tyr Ser Thr Asn Ser Asn  
 565 570 575

taa 1731

<210> 2

<211> 576

<212> PRT

<213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 2

Met Ala Asp Leu Leu Gly Ile Val Ala Ile Val Phe Phe Tyr Val Leu  
 1 5 10 15

Ile Leu Val Val Gly Ile Trp Ala Gly Arg Lys Ser Lys Ser Ser Lys  
 20 25 30

Glu Leu Glu Ser Glu Ala Gly Ala Ala Thr Glu Glu Val Met Leu Ala  
 35 40 45

Gly Arg Asn Ile Gly Thr Leu Val Gly Ile Phe Thr Met Thr Ala Thr  
 50 55 60

Trp Val Gly Gly Ala Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Leu Tyr Asn  
 65 70 75 80

Gly Gly Leu Leu Gly Cys Gln Ala Pro Val Gly Tyr Ala Ile Ser Leu  
85 90 95

Val Met Gly Gly Leu Leu Phe Ala Lys Lys Met Arg Glu Glu Gly Tyr  
100 105 110

Ile Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln His Lys Tyr Gly Gln Arg Ile Gly  
115 120 125

Gly Leu Met Tyr Val Pro Ala Leu Leu Gly Glu Thr Phe Trp Thr Ala  
130 135 140

Ala Ile Leu Ser Ala Leu Gly Ala Thr Leu Ser Val Ile Leu Gly Ile  
145 150 155 160

Asp Met Asn Ala Ser Val Thr Leu Ser Ala Cys Ile Ala Val Phe Tyr  
165 170 175

Thr Phe Thr Gly Gly Tyr Tyr Ala Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln  
180 185 190

Leu Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Val Cys Val Pro Ala Ala Met  
195 200 205

Val His Asp Gly Ala Lys Asp Ile Ser Arg Asn Ala Gly Asp Trp Ile  
210 215 220

Gly Glu Ile Gly Gly Phe Lys Glu Thr Ser Leu Trp Ile Asp Cys Met  
225 230 235 240

Leu Leu Leu Val Phe Gly Gly Ile Pro Trp Gln Val Tyr Phe Gln Arg  
245 250 255

Val Leu Ser Ser Lys Thr Ala His Gly Ala Gln Thr Leu Ser Phe Val  
260 265 270

Ala Gly Val Gly Cys Ile Leu Met Ala Ile Pro Pro Ala Leu Ile Gly  
275 280 285

Ala Ile Ala Arg Asn Thr Asp Trp Arg Met Thr Asp Tyr Ser Pro Trp  
290 295 300

Asn Asn Gly Thr Lys Val Glu Ser Ile Pro Pro Asp Lys Arg Asn Met  
305 310 315 320

Val Val Pro Leu Val Phe Gln Tyr Leu Thr Pro Arg Trp Val Ala Phe  
325 330 335

Ile Gly Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser  
340 345 350

Ser Val Leu Ser Ala Ala Ser Met Phe Ala His Asn Ile Trp Lys Leu  
355 360 365

Thr Ile Arg Pro His Ala Ser Glu Lys Glu Val Ile Ile Val Met Arg  
370 375 380

Ile Ala Ile Ile Cys Val Gly Ile Met Ala Thr Ile Met Ala Leu Thr

385

390

395

400

Ile Gln Ser Ile Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Cys Ala Asp Leu Val Tyr

405

410

415

Val Ile Leu Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Val Tyr Met Pro Arg Ser

420

425

430

Asn Thr Tyr Gly Ser Leu Ala Gly Tyr Ala Val Gly Leu Val Leu Arg

435

440

445

Leu Ile Gly Gly Glu Pro Leu Val Ser Leu Pro Ala Phe Phe His Tyr

450

455

460

Pro Met Tyr Thr Asp Gly Val Gln Tyr Phe Pro Phe Arg Thr Thr Ala

465

470

475

480

Met Leu Ser Ser Met Ala Thr Ile Tyr Ile Val Ser Ile Gln Ser Glu

485

490

495

Lys Leu Phe Lys Ser Gly Arg Leu Ser Pro Glu Trp Asp Val Met Gly

500

505

510

Cys Val Val Asn Ile Pro Ile Asp His Val Pro Leu Pro Ser Asp Val

515

520

525

Ser Phe Ala Val Ser Ser Glu Thr Leu Asn Met Lys Ala Pro Asn Gly

530

535

540



Thr Pro Ala Pro Val His Pro Asn Gln Gln Pro Ser Asp Glu Asn Thr  
545 550 555 560

Leu Leu His Pro Tyr Ser Asp Gln Ser Tyr Tyr Ser Thr Asn Ser Asn  
565 570 575

<210> 3

<211> 1743

<212> DNA

<213> Rat

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1743)

<400> 3

atg cct ttc cat gta gaa gga cta gta gcg att atc ctg ttc tac ctt 48

Met Pro Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu

1 5 10 15

ctt ata ttt ctg gtt gga ata tgg gct gca tgg aaa acc aaa aac agc 96

Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser

20 25 30

ggt aat gca gaa gaa cgc agc gaa gcc atc ata gtt ggg ggc cga gac 144

Gly Asn Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35 40 45

att ggt ttg ttg gtt ggt ggt ttt acc atg aca gcc acc tgg gtt gga 192

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

gga ggt tac atc aac ggg aca gct gaa gca gtt tat ggg cca ggt tgt 240

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys

65

70

75

80

ggt cta gct tgg gct cag gca ccc att gga tat tct ctg agt ctg att 288

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

tta ggt ggc ctg ttt ttt gca aaa cct atg cgt tcc aag gga tat gtg 336

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

act atg tta gac ccg ttt caa cag atc tat gga aag cgc atg ggt ggg 384

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

ctg ctg ttc atc cct gca ctg atg gga gag atg ttc tgg gct gca gca 432

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

att ttc tct gca tta ggg gct acc atc agc gta atc att gat gtg gat 480

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

gtg aac ata tcg gtc att gtc tcc gca ctc att gcc att ctt tat acc 528

Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr

165

170

175

ctc gtg gga ggg ctc tac tct gtg gca tat act gat gtt gta cag cta 576

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

ttc tgc att ttt ata gga ttg tgg atc agt gtc cca ttt gcc ctg tca 624

Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

cat cct gca gtc acc gac att gga ttc act gct gtg cat gct aaa tac 672

His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

cag agt ccc tgg ctg gga acc att gaa tca gtt gaa gtc tac acc tgg 720

Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp

225

230

235

240

ctt gat aat ttt ctg ttg ttg atg ctg ggt gga ata cca tgg caa gcc 768

Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

tac ttc cag agg gtc ctc tct tca tcg tca gcg acc tat gct cag gtg 816

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttt ggg tgc ctg gtg atg gct cta cca gcc 864

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala

275

280

285

att tgc att ggg gcc att gga gcc tcc aca gac tgg aac caa act gca 912

Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

tat ggg ttt cca gat ccc aag acc aag gag gaa gca gac atg att ctc 960

Tyr Gly Phe Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu

305

310

315

320

ccg att gtt cta cag tac ctc tgc cct gtg tac att tcc ttc ttt ggg 1008

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly

325

330

335

ctt ggt gct gtt tct gct gct gtc atg tcc tcg gct gac tca tcc atc 1056

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

cta tca gca agt tcc atg ttt gct cgg aat atc tac cag ctt tcc ttc 1104

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

aga caa aat gca tca gac aag gaa att gtg tgg gtc atg agg atc act 1152

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

gtg ttt gtg ttt gga gca tct gca aca gcc atg gcc ttg ctc acg aag 1200

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400

act gtg tat ggg ctc tgg tac ctg agc tct gac ctt gtc tac atc atc 1248

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile

405

410

415

atc ttc cca cag ctg ctc tgt gta ctc ttc atc aaa gga acc aac act 1296

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr

420

425

430

tat ggg gca gtt gct ggt tat att ttt gga ctt ttc ctg aga att acc 1344

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435

440

445

gga gga gag cca tat cta tac ttg cag ccc tta atc ttc tac cct ggt 1392

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly

450

455

460

tat tac cct gac aag aat ggt ata tac aat cag agg ttc cca ttt aaa 1440

Tyr Tyr Pro Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys

465

470

475

480

act ctc tcc atg gtt acc tca ttc ttt acc aac att tgt gtt tcc tat 1488

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr

485

490

495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc ttg cct cca aaa tta gat 1536

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp

500

505

510

ata ttt gat gct gtt gtc tca agg cac agt gaa gag aac atg gac aag 1584  
 Ile Phe Asp Ala Val Val Ser Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
 515 520 525

acc att cta gtc aga aat gaa aac atc aaa tta aat gaa ctt gca cct 1632  
 Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
 530 535 540

gta aag cct cga cag agc cta acc ctc agt tca act ttc acc aat aaa 1680  
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545 550 555 560

gag gct ctc ctt gat gtt gat tcc agt cca gag gga tct ggg act gaa 1728  
 Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
 565 570 575

gat aac tta caa tga 1743  
 Asp Asn Leu Gln  
 580

<210> 4

<211> 580

<212> PRT

<213> Rat

<400> 4

Met Pro Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu  
 1 5 10 15

Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser

20

25

30

Gly Asn Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys

65

70

75

80

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr

165

170

175

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp

225

230

235

240

Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala

275

280

285

Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

Tyr Gly Phe Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu

305

310

315

320



Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly

325

330

335

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile

405

410

415

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr

420

425

430

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435

440

445

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly

450

455

460

Tyr Tyr Pro Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys

465

470

475

480

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr

485

490

495

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp

500

505

510

Ile Phe Asp Ala Val Val Ser Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys

515

520

525

Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro

530

535

540

Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys

545

550

555

560

Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

565

570

575

Asp Asn Leu Gln

580

<210> 5

<211> 1743

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1743)

<400> 5

atg gct ttc cat gtg gaa gga ctg ata gct atc atc gtg ttc tac ctt 48

Met Ala Phe His Val Glu Gly Leu Ile Ala Ile Ile Val Phe Tyr Leu

1

5

10

15

cta att ttg ctg gtt gga ata tgg gct gcc tgg aga acc aaa aac agt 96

Leu Ile Leu Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Arg Thr Lys Asn Ser

20

25

30

ggc agc gca gaa gag cgc agc gaa gcc atc ata gtt ggt ggc cga gat 144

Gly Ser Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

att ggt tta ttg gtt ggt gga ttt acc atg aca gct acc tgg gtc gga 192

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

gga ggg tat atc aat ggc aca gct gaa gca gtt tat gta cca ggt tat 240

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr

65

70

75

80

ggc cta gct tgg gct cag gca cca att gga tat tct ctt agt ctg att 288

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

tta ggt ggc ctg ttc ttt gca aaa cct atg cgt tca aag ggg tat gtg 336

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

acc atg tta gac ccg ttt cag caa atc tat gga aaa cgc atg ggc gga 384

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

ctc ctg ttt att cct gca ctg atg gga gaa atg ttc tgg gct gca gca 432

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

att ttc tct gct ttg gga gcc acc atc agc gtg atc atc gat gtg gat 480

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

atg cac att tct gtc atc atc tct gca ctc att gcc act ctg tac aca 528

Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr

165

170

175

ctg gtg gga ggg ctc tat tct gtg gcc tac act gat gtc gtt cag ctc 576

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

ttt tgc att ttt gta ggg ctg tgg atc agc gtc ccc ttt gca ttg tca 624

Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

cat cct gca gtc gca gac atc ggg ttc act gct gtg cat gcc aaa tac 672

His Pro Ala Val Ala Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

caa aag ccg tgg ctg gga act gtt gac tca tct gaa gtc tac tct tgg 720

Gln Lys Pro Trp Leu Gly Thr Val Asp Ser Ser Glu Val Tyr Ser Trp

225

230

235

240

ctt gat agt ttt ctg ttg ttg atg ctg ggt gga atc cca tgg caa gca 768

Leu Asp Ser Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

tac ttt cag agg gtt ctc tct tct tcc tca gcc acc tat gct caa gtg 816

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttc ggg tgc ctg gtg atg gcc atc cca gcc 864

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Ile Pro Ala

275

280

285

ata ctc att ggg gcc att gga gca tca aca gac tgg aac cag act gca 912

Ile Leu Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

tat ggg ctt cca gat ccc aag act aca gaa gag gca gac atg att tta 960

Tyr Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr Thr Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu

305

310

315

320

cca att gtt ctg cag tat ctc tgc cct gtg tat att tct ttc ttt ggt 1008

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly

325

330

335

ctt ggt gca gtt tct gct gct gtt atg tca tca gca gat tct tcc atc 1056

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

ttg tca gca agt tcc atg ttt gca cgg aac atc tac cag ctt tcc ttc 1104

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

aga caa aat gct tcg gac aaa gaa atc gtt tgg gtt atg cga atc aca 1152

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

gtg ttt gtg ttt gga gca tct gca aca gcc atg gcc ttg ctg acg aaa 1200

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400

act gtg tat ggg ctc tgg tac ctc agt tct gac ctt gtt tac atc gtt 1248

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val

405

410

415

atc ttc ccc cag ctg ctt tgt gta ctc ttt gtt aag gga acc aac acc 1296

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr

420

425

430

tat ggg gcc gtg gca ggt tat gtt tct ggc ctc ttc ctg aga ata act 1344

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435

440

445

gga ggg gag cca tat ctg tat ctt cag ccc ttg atc ttc tac cct ggc 1392  
 Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
 450 455 460

tat tac cct gat gat aat ggt ata tat aat cag aaa ttt cca ttt aaa 1440  
 Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys  
 465 470 475 480

aca ctt gcc atg gtt aca tca ttc tta acc aac att tgc atc tcc tat 1488  
 Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr  
 485 490 495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc ttg cca cct aaa tta gat 1536  
 Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
 500 505 510

gta ttt gat gct gtt gtt gca aga cac agt gaa gaa aac atg gat aag 1584  
 Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
 515 520 525

aca att ctt gtc aaa aat gaa aat att aaa tta gat gaa ctt gca ctt 1632  
 Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu  
 530 535 540

gtg aag cca cga cag agc atg acc ctc agc tca act ttc acc aat aaa 1680  
 Val Lys Pro Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545 550 555 560

gag gcc ttc ctt gat gtt gat tcc agt cca gaa ggg tct ggg act gaa 1728

Glu Ala Phe Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

565

570

575

gat aat tta cag tga

1743

Asp Asn Leu Gln

580

<210> 6

<211> 580

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Ala Phe His Val Glu Gly Leu Ile Ala Ile Ile Val Phe Tyr Leu

1

5

10

15

Leu Ile Leu Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Arg Thr Lys Asn Ser

20

25

30

Gly Ser Ala Glu Glu Arg Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Val Pro Gly Tyr

65

70

75

80



Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile  
85 90 95

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val  
100 105 110

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly  
115 120 125

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala  
130 135 140

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp  
145 150 155 160

Met His Ile Ser Val Ile Ile Ser Ala Leu Ile Ala Thr Leu Tyr Thr  
165 170 175

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu  
180 185 190

Phe Cys Ile Phe Val Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser  
195 200 205

His Pro Ala Val Ala Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr  
210 215 220

Gln Lys Pro Trp Leu Gly Thr Val Asp Ser Ser Glu Val Tyr Ser Trp  
225 230 235 240

Leu Asp Ser Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Ile Pro Ala

275

280

285

Ile Leu Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala

290

295

300

Tyr Gly Leu Pro Asp Pro Lys Thr Thr Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu

305

310

315

320

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly

325

330

335

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile

340

345

350

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe

355

360

365

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr

370

375

380

Val Phe Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385

390

395

400

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Val

405

410

415

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Val Lys Gly Thr Asn Thr

420

425

430

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Val Ser Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435

440

445

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly

450

455

460

Tyr Tyr Pro Asp Asp Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Lys Phe Pro Phe Lys

465

470

475

480

Thr Leu Ala Met Val Thr Ser Phe Leu Thr Asn Ile Cys Ile Ser Tyr

485

490

495

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp

500

505

510

Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys

515

520

525

Thr Ile Leu Val Lys Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asp Glu Leu Ala Leu

530

535

540

Val Lys Pro Arg Gln Ser Met Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
 545 550 555 560

Glu Ala Phe Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
 565 570 575

Asp Asn Leu Gln  
 580

<210> 7

<211> 1743

<212> DNA

<213> Mouse

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1743)

<400> 7

atg tct ttc cac gta gaa gga ctg gta gct att atc ctc ttc tac ctc 48  
 Met Ser Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu  
 1 5 10 15

ctt ata ttt ctg gtt gga ata tgg gct gca tgg aaa acc aaa aac agc 96  
 Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser  
 20 25 30

ggc aac cca gaa gag cac agt gaa gcc atc ata gtc ggg ggc cgt gac 144

Gly Asn Pro Glu Glu His Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35

40

45

att ggt ttg ttg gtt ggt ggt ttt acc atg aca gcc acc tgg gtt gga 192

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50

55

60

gga ggc tac atc aat ggg aca gca gaa gca gtg tat ggg cca ggt tgt 240

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys

65

70

75

80

ggt cta gct tgg gct cag gca ccc att gga tat tct ctg agt cta att 288

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85

90

95

tta ggt ggt ctg ttt ttt gcg aaa cct atg cgt tcc aag gga tat gtg 336

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100

105

110

act atg tta gac cca ttt caa cag atc tat gga aag cgc atg ggt ggg 384

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115

120

125

ctg ctc ttc atc cct gca ctg atg gga gag atg ttc tgg gct gca gca 432

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130

135

140

att ttc tct gca tta ggg gcc acc atc agc gtg atc att gat gtg gat 480

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145

150

155

160

gtg aac ata tcg gtc att gtc tct gca ctc att gcc att ctt tat acc 528

Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr

165

170

175

cta gtg ggt ggg ctc tac tct gtg gca tat act gat gtt gtc cag cta 576

Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu

180

185

190

ttc tgc att ttt ata gga ctg tgg atc agt gtc cct ttt gcc ctg tca 624

Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser

195

200

205

cat cct gca gtc acc gac atc gga ttc aca gct gtg cat gct aaa tac 672

His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr

210

215

220

cag agt ccc tgg ctg gga acc att gaa tca gtt gaa gtc tac acc tgg 720

Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp

225

230

235

240

ctt gat aat ttt ctg tta ttg atg ctg ggt gga atc cca tgg caa gcc 768

Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala

245

250

255

tac ttc cag agg gtc ctc tct tca tcc tca gcc acc tat gct cag gta 816

Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val

260

265

270

ctg tcc ttc ctg gca gct ttt ggg tgc ctg gtg atg gct cta ccc gcc 864  
 Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala  
 275 280 285

ata tgc ata gga gct att gga gct tcc aca gac tgg aac cag act gcc 912  
 Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala  
 290 295 300

tac ggg tat cca gat ccc aag act aag gag gaa gca gac atg att ctc 960  
 Tyr Gly Tyr Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
 305 310 315 320

ccg atc gtt ctg cag tac ctc tgc cct gtg tac atc tcc ttc ttt ggg 1008  
 Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
 325 330 335

ctt ggt gct gtt tca gct gct gtc atg tcc tca gct gac tcg tcc atc 1056  
 Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
 340 345 350

ctg tcg gcg agt tct atg ttt gct cgg aat atc tac cag ctt tcc ttc 1104  
 Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
 355 360 365

aga caa aat gca tca gac aag gaa att gtg tgg gtc atg agg atc act 1152  
 Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
 370 375 380

gtg ctt gtg ttc gga gca tct gca aca gcc atg gct ttg ctg acg aag 1200

Val Leu Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys

385 390 395 400

act gtg tat ggg ctc tgg tac ctg agc tct gac ctt gtc tac atc atc 1248

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile

405 410 415

atc ttc cca cag ctg ctc tgt gta ctc ttc atc aaa gga acc aac act 1296

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr

420 425 430

tat ggg gca gtt gct ggt tat att ttt gga cta ttc ctg aga att act 1344

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr

435 440 445

gga gga gag cca tat cta tac ttg cag ccc tta atc ttc tac cct ggt 1392

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly

450 455 460

tat tac tct gac aag aat ggt ata tac aat cag agg ttc cca ttt aaa 1440

Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys

465 470 475 480

act ctc tcc atg gtt acc tca ttc ttt acc aac att tgt gtt tct tat 1488

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr

485 490 495

cta gcc aag tat cta ttt gaa agt gga acc ttg cct cca aaa tta gat 1536



Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp

500

505

510

gta ttt gat gct gtt gtc gca agg cac agt gaa gag aac atg gac aag 1584

Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys

515

520

525

acc att cta gtc aga aat gaa aat atc aaa tta aat gaa ctt gca cct 1632

Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro

530

535

540

gtg aaa cct cgg cag agc cta acc ctc agt tca act ttc acc aat aag 1680

Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys

545

550

555

560

gag gcc ctc ctt gat gtt gat tcc agt ccg gag ggg tct ggg act gaa 1728

Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu

565

570

575

gat aac tta caa tga

1743

Asp Asn Leu Gln

580

<210> 8

<211> 580

<212> PRT

<213> Mouse

<400> 8

Met Ser Phe His Val Glu Gly Leu Val Ala Ile Ile Leu Phe Tyr Leu

1 5 10 15

Leu Ile Phe Leu Val Gly Ile Trp Ala Ala Trp Lys Thr Lys Asn Ser

20 25 30

Gly Asn Pro Glu Glu His Ser Glu Ala Ile Ile Val Gly Gly Arg Asp

35 40 45

Ile Gly Leu Leu Val Gly Gly Phe Thr Met Thr Ala Thr Trp Val Gly

50 55 60

Gly Gly Tyr Ile Asn Gly Thr Ala Glu Ala Val Tyr Gly Pro Gly Cys

65 70 75 80

Gly Leu Ala Trp Ala Gln Ala Pro Ile Gly Tyr Ser Leu Ser Leu Ile

85 90 95

Leu Gly Gly Leu Phe Phe Ala Lys Pro Met Arg Ser Lys Gly Tyr Val

100 105 110

Thr Met Leu Asp Pro Phe Gln Gln Ile Tyr Gly Lys Arg Met Gly Gly

115 120 125

Leu Leu Phe Ile Pro Ala Leu Met Gly Glu Met Phe Trp Ala Ala Ala

130 135 140

Ile Phe Ser Ala Leu Gly Ala Thr Ile Ser Val Ile Ile Asp Val Asp

145	150	155	160
Val Asn Ile Ser Val Ile Val Ser Ala Leu Ile Ala Ile Leu Tyr Thr			
165	170	175	
Leu Val Gly Gly Leu Tyr Ser Val Ala Tyr Thr Asp Val Val Gln Leu			
180	185	190	
Phe Cys Ile Phe Ile Gly Leu Trp Ile Ser Val Pro Phe Ala Leu Ser			
195	200	205	
His Pro Ala Val Thr Asp Ile Gly Phe Thr Ala Val His Ala Lys Tyr			
210	215	220	
Gln Ser Pro Trp Leu Gly Thr Ile Glu Ser Val Glu Val Tyr Thr Trp			
225	230	235	240
Leu Asp Asn Phe Leu Leu Leu Met Leu Gly Gly Ile Pro Trp Gln Ala			
245	250	255	
Tyr Phe Gln Arg Val Leu Ser Ser Ser Ser Ala Thr Tyr Ala Gln Val			
260	265	270	
Leu Ser Phe Leu Ala Ala Phe Gly Cys Leu Val Met Ala Leu Pro Ala			
275	280	285	
Ile Cys Ile Gly Ala Ile Gly Ala Ser Thr Asp Trp Asn Gln Thr Ala			
290	295	300	

Tyr Gly Tyr Pro Asp Pro Lys Thr Lys Glu Glu Ala Asp Met Ile Leu  
305 310 315 320

Pro Ile Val Leu Gln Tyr Leu Cys Pro Val Tyr Ile Ser Phe Phe Gly  
325 330 335

Leu Gly Ala Val Ser Ala Ala Val Met Ser Ser Ala Asp Ser Ser Ile  
340 345 350

Leu Ser Ala Ser Ser Met Phe Ala Arg Asn Ile Tyr Gln Leu Ser Phe  
355 360 365

Arg Gln Asn Ala Ser Asp Lys Glu Ile Val Trp Val Met Arg Ile Thr  
370 375 380

Val Leu Val Phe Gly Ala Ser Ala Thr Ala Met Ala Leu Leu Thr Lys  
385 390 395 400

Thr Val Tyr Gly Leu Trp Tyr Leu Ser Ser Asp Leu Val Tyr Ile Ile  
405 410 415

Ile Phe Pro Gln Leu Leu Cys Val Leu Phe Ile Lys Gly Thr Asn Thr  
420 425 430

Tyr Gly Ala Val Ala Gly Tyr Ile Phe Gly Leu Phe Leu Arg Ile Thr  
435 440 445

Gly Gly Glu Pro Tyr Leu Tyr Leu Gln Pro Leu Ile Phe Tyr Pro Gly  
450 455 460

Tyr Tyr Ser Asp Lys Asn Gly Ile Tyr Asn Gln Arg Phe Pro Phe Lys  
465 470 475 480

Thr Leu Ser Met Val Thr Ser Phe Phe Thr Asn Ile Cys Val Ser Tyr  
485 490 495

Leu Ala Lys Tyr Leu Phe Glu Ser Gly Thr Leu Pro Pro Lys Leu Asp  
500 505 510

Val Phe Asp Ala Val Val Ala Arg His Ser Glu Glu Asn Met Asp Lys  
515 520 525

Thr Ile Leu Val Arg Asn Glu Asn Ile Lys Leu Asn Glu Leu Ala Pro  
530 535 540

Val Lys Pro Arg Gln Ser Leu Thr Leu Ser Ser Thr Phe Thr Asn Lys  
545 550 555 560

Glu Ala Leu Leu Asp Val Asp Ser Ser Pro Glu Gly Ser Gly Thr Glu  
565 570 575

Asp Asn Leu Gln  
580

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明の線虫 *cho-1* (C48D1.3 cRNA) または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コリンの取り込み結果を示す図である。

【図 2】

本発明の線虫 *cho-1* (C48D1.3 cRNA) または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の  $\text{Na}^+$  の依存性によるコリン取り込みに対する効果の結果を示す図である。

【図 3】

本発明の線虫 *cho-1* (C48D1.3 cRNA) または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の HC3 によるコリン取り込みの阻害の結果を示す図である。

【図 4】

本発明のラット CHT1 及び線虫 *CHO-1* のそれぞれのアミノ酸配列を示す図である。

【図 5】

線虫の神経系で本発明の *cho-1::gfp* を発現している神経細胞の分布を示す図である。

【図 6】

$\text{Na}^+$  依存性グルコーストランスポーターファミリーの系統樹を示す図である。

【図 7】

本発明のラット CHT1 の予想されるトポロジーを示す図である。

【図 8】

本発明のラット組織での CHT1 mRNA 転写産物のノザン解析の結果を示す図である。

【図 9】

本発明のラット脳における CHT1 転写産物の *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

【図 10】

本発明の脊髄における CHT1 転写産物の *in situ* ハイブリダイゼーション解析の結果を示す図である。

【図 1 1】

本発明の CHT 1 cRNA または水を注入したアフリカツメガエル卵母細胞の [ $^3\text{H}$ ] コリンの取り込みの結果を示す図である。

【図 1 2】

本発明の CHT 1 のコリン濃度によるコリン取り込みに対する効果を示す図である。

【図 1 3】

本発明の CHT 1 の HC 3 によるコリン取り込みの阻害の結果を示す図である。

【図 1 4】

本発明の CHT 1 の  $\text{Na}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  依存性によるコリン取り込みの結果を示す図である。

【図 1 5】

本発明の CHT 1 cDNA あるいはベクター p cDNA 3. 1 をそれぞれ導入した COS 7 細胞から調製した膜への [ $^3\text{H}$ ] HC 3 結合結果を示す図である。

【図 1 6】

本発明の CHT 1 cDNA あるいはベクター p cDNA 3. 1 をそれぞれ導入した COS 7 細胞から調製した膜への特異的 [ $^3\text{H}$ ] HC 3 結合の飽和解析の結果を示す図である。

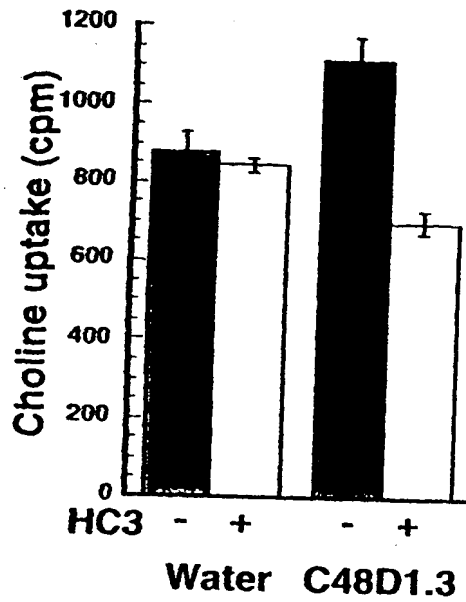
【図 1 7】

本発明の HC 3、コリン (Cho)、アセチルコリン (ACh) による特異的 [ $^3\text{H}$ ] HC 3 結合の置換の結果を示す図である。

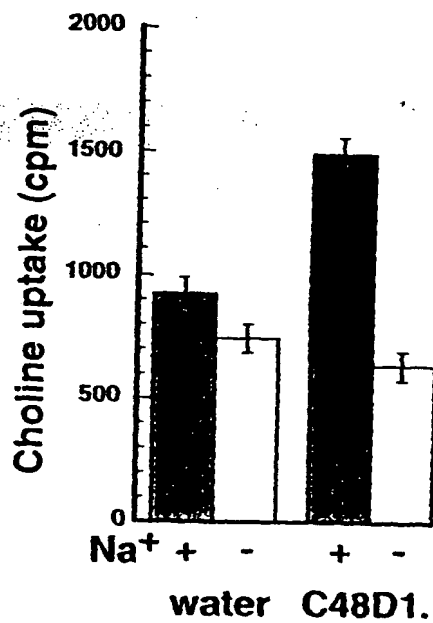
【書類名】

図面

【図 1】

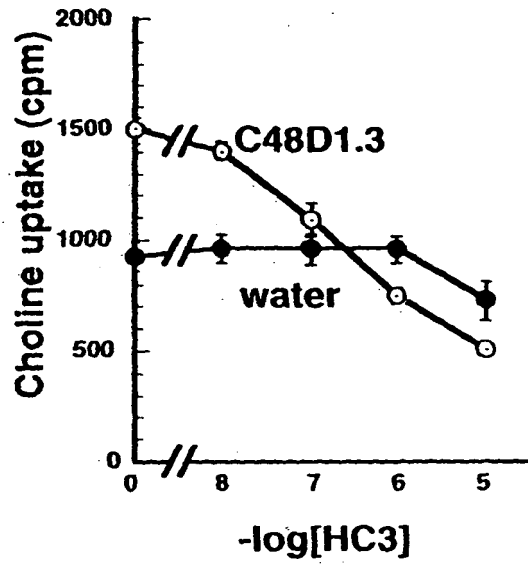


【図 2】





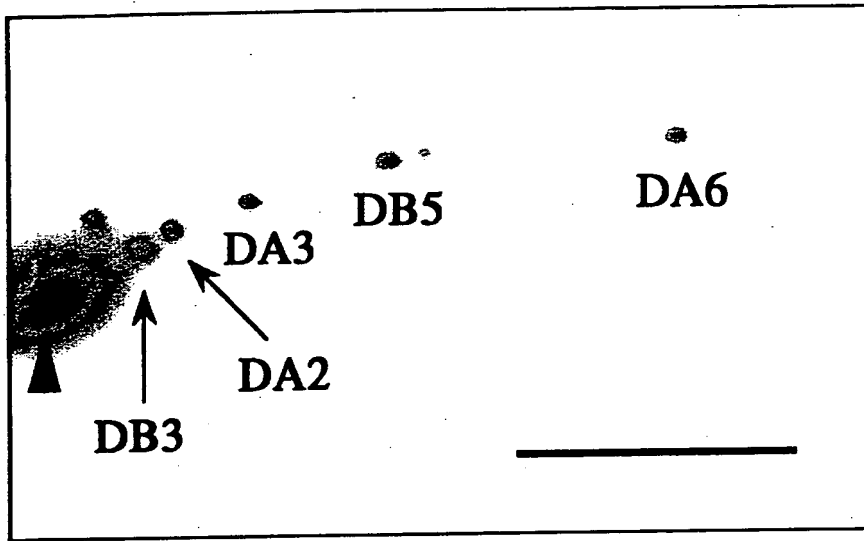
【図 3】



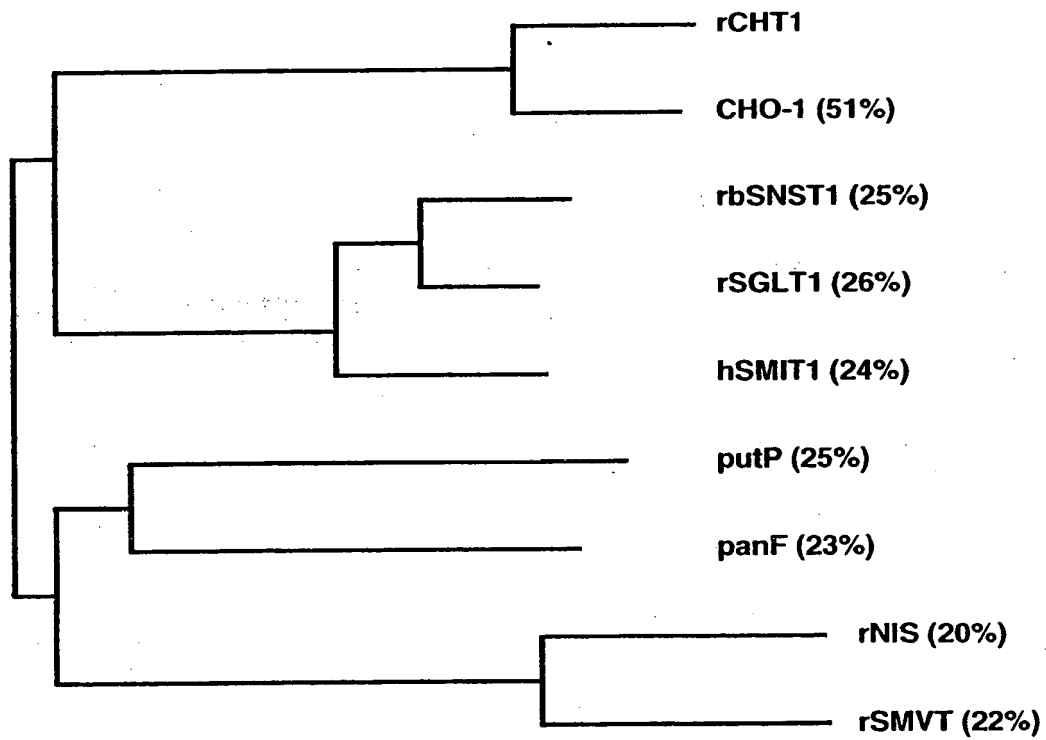
【图 4】

CHT1	MPFHVEGLVAITLFFYLILFLVGIWAANKTKNS-----GNAEERSEATTVGGRTGLLVGGF	56
cht-1	-MADLLGIIVAIFFYLILFLVGIWAGRKSKSSKELESEAGAATEEVMLAGRNIGTLVGIF	59
I		
CHT1	TMTATWVGCGYINGTAEAVYGPCCGLAWAQAPITGYSLSLGGGLFFAKPMRSKGYMTMLD	116
cht-1	TMTATWVGAYINGTAEAYNG--GLLGCQAPVGYATSLVGGGLFFAKMREEGYITMLD	117
II		
CHT1	PFQQTIGKRYGGGLLEIPALMGEMFWAAATFSALGATISVITDVDNIIISVILSALIAITLYT	176
cht-1	PFQHKYGORIGGLMYVPALLGETFWTAATFSALGATISVILGIDNASVITISACIAVFTY	177
III IV		
CHT1	LVGGLYSVAYTDVVQLFCIFVGLWISVPFALSHPVVTDIGFTAVHAKYQSPWLGTTIES-V	235
cht-1	FTGGYYAVAYTDVVQLFCIFVGLWYCVPAAMVHDGAKDISRNAG-----DWLGETGGGFK	231
V		
CHT1	EVYTMLDNELLMLGGIPWQAYFQFVLSSSSATYAQVLSFLAAGGLVMALPAICIGATIG	295
cht-1	ETSLMIDCMLLLMLGGIPWQVYFQFVLSSTIAHGAQTLSEVAGVGCILMATIPPALIGATA	291
VI VII		
CHT1	ASTDWNQATAGFPDPKTKKEAD-----MILPIVLQYLCVYISFFGLGAVSAAMSSAD	349
cht-1	RNTDWRMTDYSPWNGTKVESIPDPKRNWVPLVFOYLTPRIYAFIQLGAVSAAMSSAD	351
VIII		
CHT1	SSILSASSMFARNIYQLSFRONASDKEIVWMRITVEVFGASATAMALLTKITVYGLWYLS	409
cht-1	SSVLSAASSMFAHNIWKLIFRPEASEKEVITVMRIATLCVGIMATIMALTIOSTYGLWYLC	411
IX		
CHT1	SDLVYIILFFPQLLCVLETKGINTYGAVAGYIFGLFLRITGGEPYLYLQPLIFYPGYYPDK	469
cht-1	ADLVYIILFFPQLLCVYMPRSNTYGSAGYAVGLVLRITGGEPVSLPAFFHYPMYT--D	469
X XI		
CHT1	NGIYNORFPFKTLSMVISFTNICVSYLAKYLFESGTLPPKLDIEDAVVSR---HSEENM	526
cht-1	G---VOYFPPRTTANLSSMATIYIVSIQSEKLFKSGRLSPEWDMGCVVNIPIDHVPLPS	526
XII		
CHT1	DKTILVRNENIKLNELAPVKPRQSLTSSFTNKEALLDVDSSPEGSGTEDNLQ	580
cht-1	DVSEAVSSE--TLNMKAPNGTPAPVHPNQPSDENTLLHPYSDQSYYSTNSN--	576

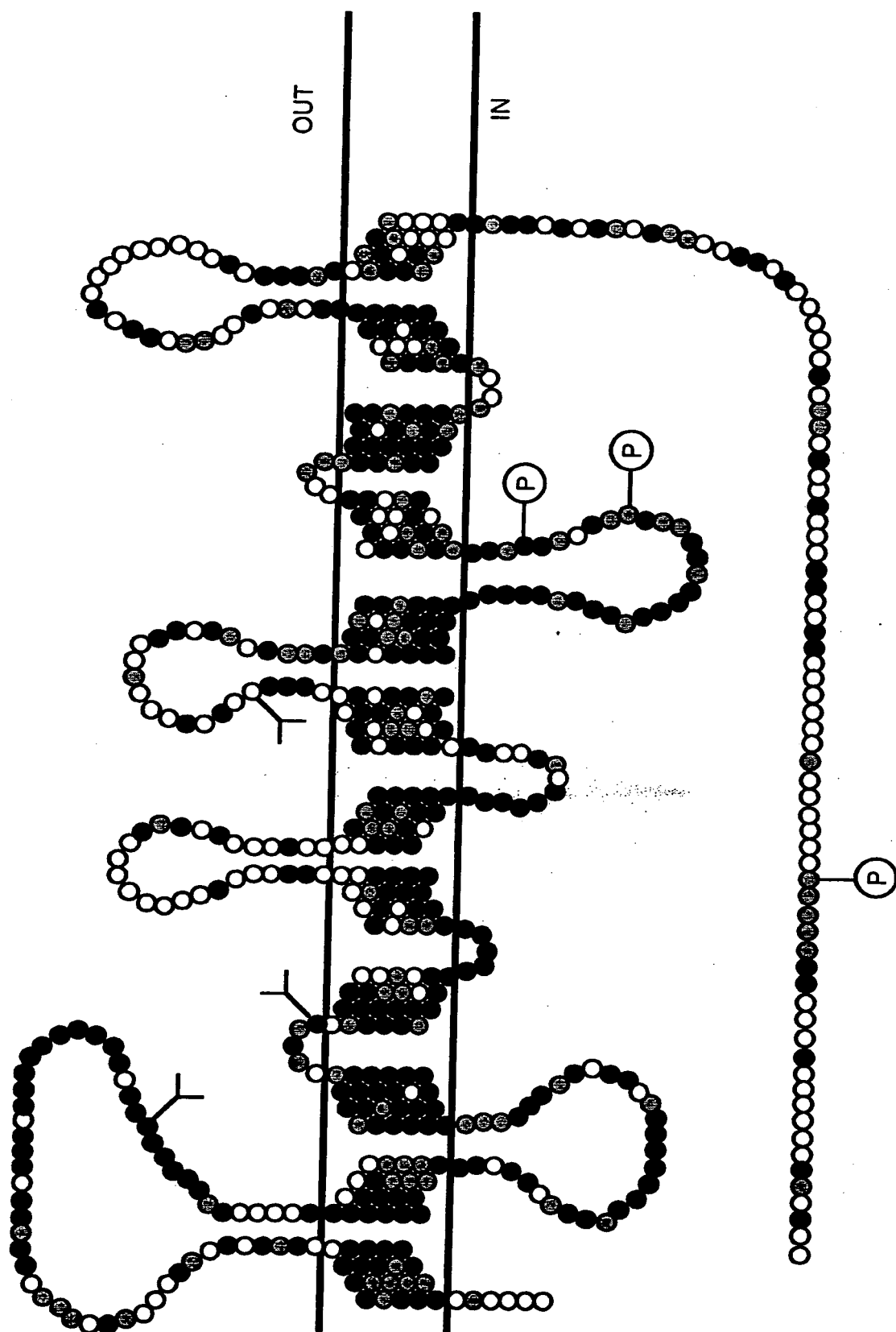
【図 5】



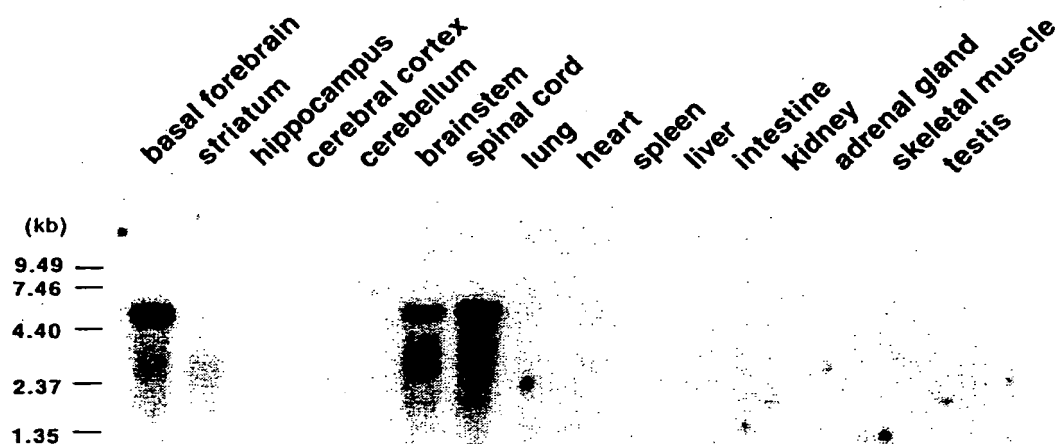
【図 6】



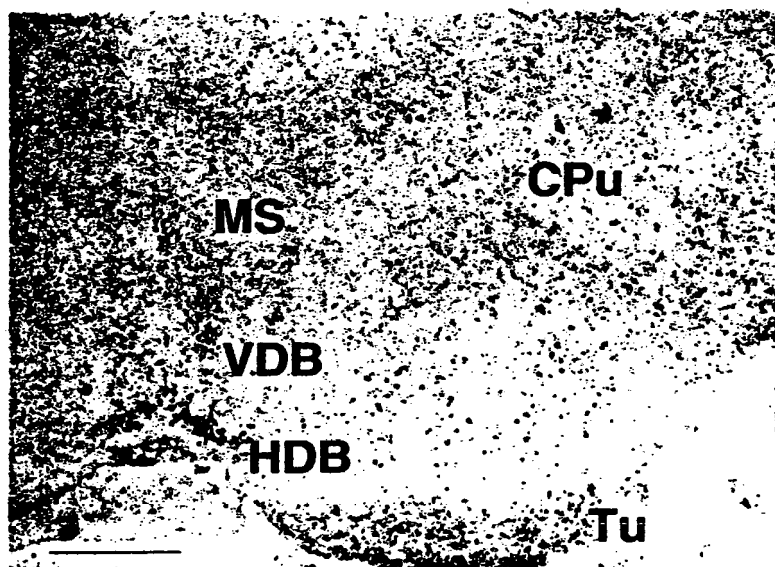
【図 7】



【図 8】



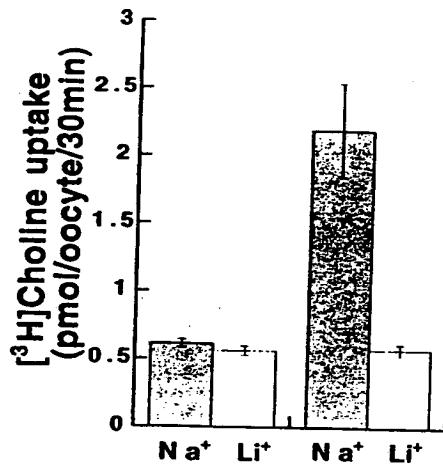
【図 9】



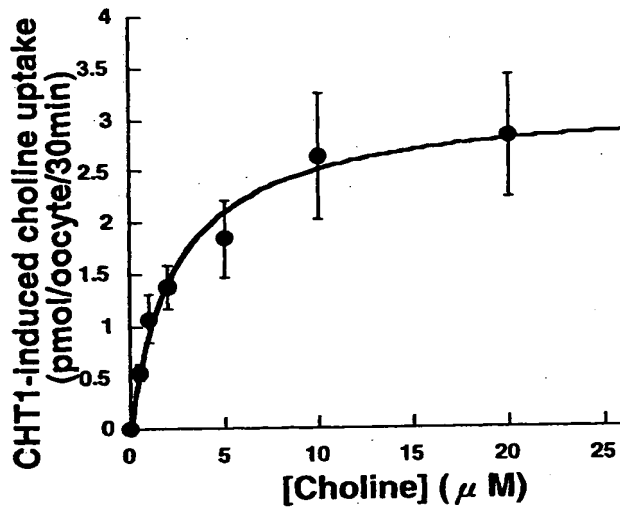
【図 10】



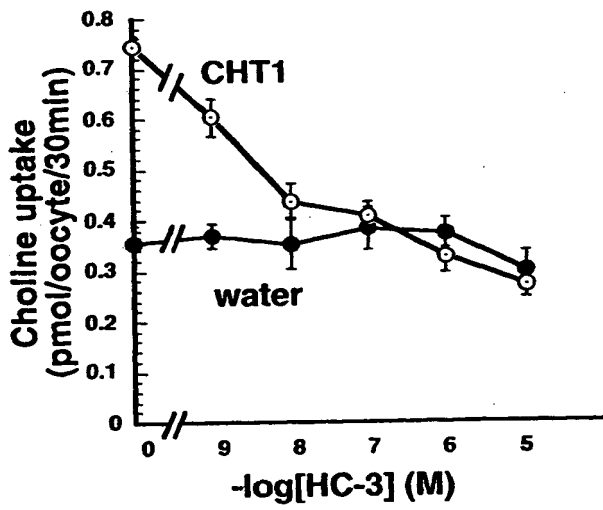
【図 11】



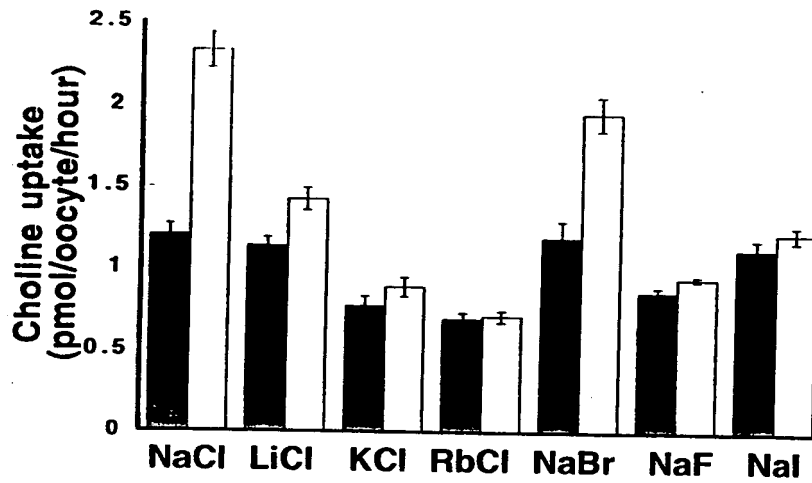
【図 1 2】



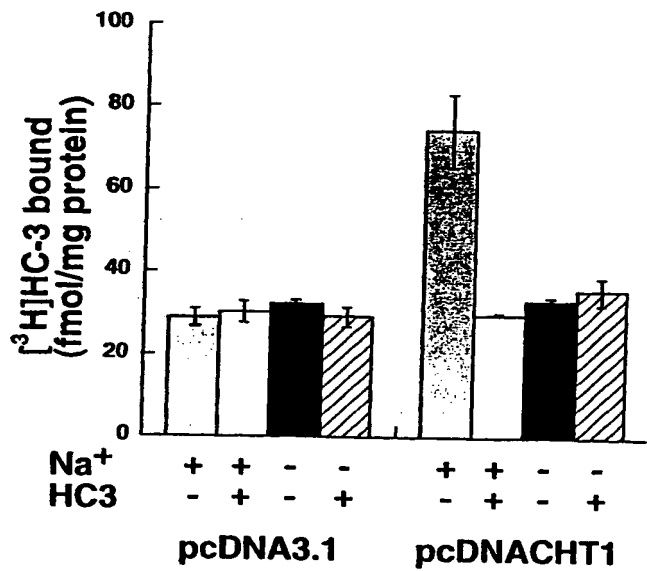
【図 1 3】



【図 1 4】

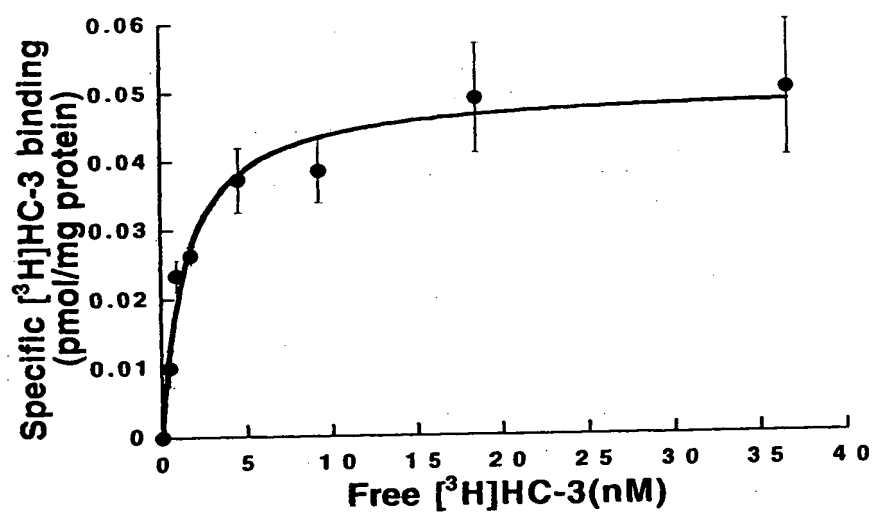


【図 1 5】

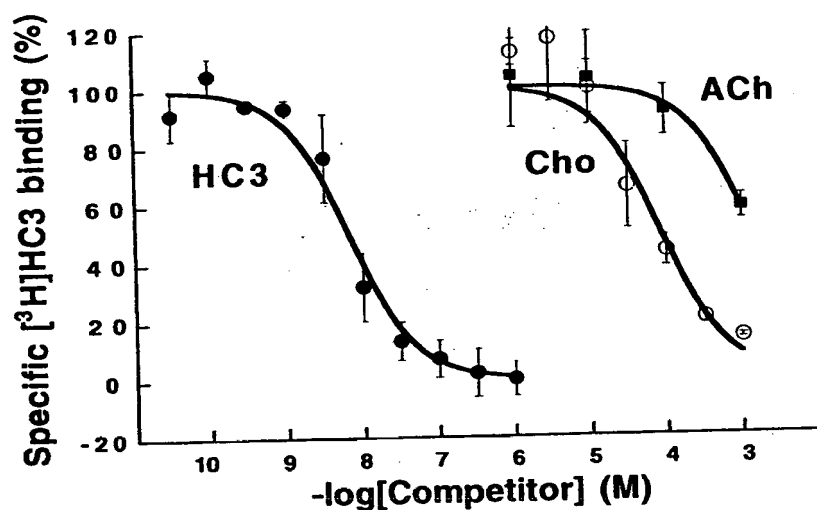




【図 16】



【図 17】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 生理的に重要である高親和性コリントランスポーター活性を有するタンパク質、それをコードする遺伝子及びそれらを利用した高親和性コリントランスポーター活性促進物質のスクリーニング方法等を提供すること。

【解決手段】 線虫 (*C. elegans*) のゲノム配列から予測される  $\text{Na}^+$  依存性トランスポーター cDNA についてアフリカツメガエルの卵母細胞発現系で高親和性コリン取り込み活性を調べることにより、線虫高親和性コリントランスポーターの cDNA (*cho-1*) を同定し、この cDNA との塩基配列の相同性を指標にラット脊髄からラット高親和性コリントランスポーターの cDNA (*CHT1*) をクローニングする。同様に、ヒトゲノムからヒト高親和性コリントランスポーターの cDNA をクローニングする。

【選択図】 図4

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日

1998年 2月24日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

氏 名

科学技術振興事業団

